

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismos de resistencia a antibióticos: biología estructural de proteínas del reciclaje de la pared bacteriana de *P. aeruginosa***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Teresa Domínguez-Gil Velasco**

Director

**Juan Antonio Hermoso Domínguez**

**Madrid, 2017**

---

# Mecanismos de resistencia a antibióticos: biología estructural de proteínas del reciclaje de la pared bacteriana de *P. aeruginosa*.

---

Teresa Domínguez-Gil Velasco

*Universidad Complutense de Madrid*

*Consejo Superior de Investigaciones Científicas*







**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismos de resistencia a antibióticos: biología estructural de proteínas del reciclaje de la pared bacteriana de *P. aeruginosa*.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Teresa Domínguez-Gil Velasco**

**Director**

**Juan Antonio Hermoso Domínguez**

**Madrid, 2016**



---

Esta tesis fue realizada gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2012-054084) a Teresa Domínguez- Gil Velasco durante el período comprendido entre Diciembre de 2012 y Diciembre de 2016, por parte del Ministerio de Economía y Competitividad.

El Ministerio de Economía y Competitividad concedió a Teresa Domínguez- Gil Velasco una beca para realizar una estancia breve en la Universidad de Notre Dame (In, USA) entre el 28 de abril y el 25 de Julio de 2014 bajo la tutela del profesor Shahriar Mobashery.





El Dr. **Juan Antonio Hermoso Domínguez**, Profesor de Investigación del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física “Rocasolano” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) certifica que: Doña Teresa Domínguez-Gil Velasco, Licenciada en Químicas por la Universidad de Oviedo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “Mecanismos de resistencia a antibióticos: biología estructural de proteínas del reciclaje de la pared bacteriana de *P. aeruginosa*.” en el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física “Rocasolano” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC)

En mi opinión, este trabajo reúne las condiciones exigidas por la legislación vigente y tiene la originalidad, rigor y la calidad científica necesarios y suficientes para ser presentado por Doña Teresa Domínguez-Gil Velasco para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que así conste y con efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Madrid, a 6 de Octubre de 2016.

Fdo: Dr. Juan Antonio Hermoso Domínguez  
Profesor de Investigación CSIC

---

---

A mi padre, por invertir en mi tiempo

“El triunfo no está en vencer siempre, sino en nunca rendirse”

Anónimo





---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y en este caso por orden de importancia para mí, me gustaría agradecer a mi director de tesis Juan A. Hermoso la confianza que depositó en mí. Haber recorrido este camino contigo ha sido un honor y un auténtico placer. Te quiero dar las gracias por toda la paciencia que has tenido, que a día de hoy me doy cuenta de que es infinita. Siempre me dices que cuando me vaya os voy a echar de menos y yo siempre supe que no voy a encontrar un lugar mejor que el “Roca”, aquí me he sentido apoyada y acogida siempre. Te agradezco mucho el haber sido conmigo una persona crítica cuando ha sido necesario, esto me ha hecho crecer como persona y como profesional. Gracias.

En segundo lugar me gustaría agradecer al profesor Martín Martínez Ripoll por todas las enseñanzas (que no han sido pocas) en el campo de la cristalografía, pero la más importante (que me la llevo al terreno personal), es la humildad con la que manejas lo buen científico y mejor persona que eres. Gracias porque eres un ejemplo a seguir en todos los sentidos.

No menos importante es el Prof. Shahriar Mobashery, gracias a él, toda esta labor se ha podido llevar a cabo con un rigor científico y una pureza insuperable. Gracias a ti Shahriar, mi tesis y mi formación como investigadora se ha visto enriquecida sustancialmente. Y gracias también por acogerme como a una amiga durante mis dos estancias en la Universidad de Notre Dame. Aprovecho también para agradecer a mis compañeros de Notre Dame por brindarme tan buena acogida: Kiran, Maria, Andreas, Dusan, David, Renee, Jenifer, Stefania, Masa, Huan, Eduard, Blas,...quiero mencionar en particular a Elena que ha sido una excelente compañera y mejor amiga.

De forma especial en esta tesis me gustaría incluir a la súper doctora Cecilia Artola compañera y amiga de vida; sabes que aprendí de ti en mis primeros años de tesis pero a día de hoy me sigues enseñando en muchos aspectos de la vida, gracias por todo.

Me gustaría agradecer también al resto de jefes del departamento que han estado siempre dispuestos a echar una mano.

---

Ahora toca un momento muy especial que es el de agradecer a todos mis compañeros de todos estos años. A todos y cada uno de vosotros, gracias. El haber recorrido esta etapa a vuestro lado ha sido para mí un privilegio.

Gracias a Mer, Elsa, María y Noe porque sois mis amigas, porque habéis estado a mi lado en lo bueno y en lo malo. Gracias a Antonio, Juanlu, Yani, Maite, Rocío, Jorge, Siseth, Mangi y Rafa porque habéis sido mucho más que compañeros.

Al grupo de Juan os agradezco a todos, las aportaciones científicas y en el terreno personal no me quiero olvidar de Ser, por cuidarnos tan bien, de Martín por el buen rollo y la mejor onda (aunque eres un pelota), de Lisandro porque te considero un buen amigo, me lo has demostrado cuando ha sido necesario y de mi querido Iván porque sin ti nada habría sido igual (ni parecido).

Me gustaría también agradecer a mis compañeros del Instituto Rocasolano que no son de mi departamento: Ioanna, Migueles, Mon, Angélica y Erney. Gracias por todas las risas extraoficiales, en especial a ti Erney, porque en esta última etapa te has convertido en una pieza fundamental del puzzle. Gracias por poner a mi vida esa nota caribeña tan mágica pero que siempre tiene los pies tan en la tierra.

A mi familia de palo: Julia, Lara, Marta, Ana, Cris e Ire. Gracias porque os quiero tanto y me hacéis tanta falta que podría decir que sin vosotras nada de esto hubiese ocurrido, así que de todo corazón: Gracias.

A ti Lu te dedico un pequeño rincón porque quiero agradecerte la compañía de estos dos últimos viajes que han cambiado nuestra forma de ver las cosas. Lo que hemos vivido es ya parte de nosotras. Te quiero muy fuerte, ya lo sabes.

Yo se que tú no quieres agradecimientos (sino llevas la contraria te mueres obvio) por lo tanto he pensado que en vez de agradecerte el haber sido el pilar fundamental de esta tesis voy a agradecer a esta tesis el haberme dado la oportunidad de haber conocido a una de las mejores personas que me he cruzado en el camino. Gracias tesis por presentarme a Alexander.

Esta tesis está dedicada a mi padre, porque para mí es un arquetipo de todo. Me ha enseñado a entender las cosas desde otro punto de vista. Para mí, mi padre no es sólo un ejemplo de superación en el terreno profesional, sino que es el mejor ejemplo que he visto a lo

---

largo de mi vida sobre lo que es triunfar en la misma, y luchar por aquello que deseas. Esta tesis me gustaría dedicártela porque sé, que si la vida te hubiese dado la oportunidad hubieses sido un gran científico, aunque nos habríamos perdido al mejor artista, por eso creo que en cualquier caso hemos ganado. Me gustaría ya que tengo la oportunidad bajo estas líneas agradecer a mamá y a ti el haberme dedicado tiempo. Me considero una persona realmente afortunada por haber estado rodeada siempre de tanto amor y tanto apoyo. A mi madre también me gustaría agradecerle todo el sustento que me ha dado siempre, porque si en algún momento me he sentido sola, tu calor nubla toda esa soledad. Porque has estado ahí para mí siempre y eso es algo que por mucho que te agradezca NUNCA va a ser suficiente.

Gracias a mi hermano, por estar, por enseñarme que el tiempo no es oro, porque el oro no vale nada ;-).

Gracias a mis tres abuelos, en especial a mi abuelo Antolín que tanto ama la vida.

Y por último me gustaría agradecer a Elías, Natalie, Javier, Millo, Teo, Mingma Sherpa, Ivonne, Carol, “el tito” y toda esa gente que me he cruzado en el camino y han hecho de mi mejor persona.

“La peor forma de injusticia es la justicia simulada”.

Platón

“Las cosas no son como las vemos, las vemos como somos”

Talmud

"The woman who follows the crowd will usually go no further than the crowd. The woman who walks alone is likely to find herself in places no one has ever been before"

Albert Einstein



# Índice

<a href="#">RESUMEN</a>	17
<a href="#">SUMMARY</a>	19
<a href="#">ABREVIATURAS</a>	23
<a href="#">1. OBJETIVOS</a>	25
<a href="#">2. INTRODUCCIÓN</a>	29
2.1. ESTRUCTURA EXTRACELULAR: MEMBRANA CELULAR Y PARED CELULAR	32
2.2. DIFERENCIAS ENTRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	33
2.3. REMODELADO DE LA PARED BACTERIANA	34
2.4. BIOSÍNTESIS DE LA PARED BACTERIANA	35
2.5. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	37
2.6. INDUCCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS	39
2.7. CÓMO LOS ANTIBIÓTICOS MATAN A LAS BACTERIAS	40
2.8. LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS	41
2.9. REDUNDANCIA Y SUPRESIÓN DE LAS LTS	43
<a href="#">3. MATERIALES Y MÉTODOS</a>	45
3.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	48
3.2. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	48
3.2.1. NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO CRISTALINO	48
3.2.2. METODOLOGÍAS DE CRISTALIZACIÓN	49
3.3. RAYOS X Y DIFRACCIÓN	51
3.4. FUENTES DE RADIACIÓN X	52
3.5. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN LOS CRISTALES	54
3.6. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS	55
3.7. RESOLUCIÓN DEL PROBLEMA DE LAS FASES	58
3.7.1. REEMPLAZO MOLECULAR ( <i>MR: MOLECULAR REPLACEMENT</i> )	59
3.7.2. REEMPLAZO ISOMORFO MÚLTIPLE ( <i>MIR: MULTIPLE ISOMORPHOUS REPLACEMENT</i> )	59
3.7.3. DIFRACCIÓN ANÓMALA MÚLTIPLE ( <i>MAD: MULTI-WAVELENGTH ANOMALOUS DIFFRACTION</i> ) / <i>SAD</i> ( <i>SINGLE-WAVELENGTH ANOMALOUS DIFFRACTION</i> )	60
3.7.4. MÉTODOS <i>AB INITIO</i>	61
3.8. REFINAMIENTO ESTRUCTURAL Y MODELO FINAL	61
3.9. VALIDACIÓN DEL MODELO	62
<a href="#">4. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN</a>	65
4.1 MECANISMOS MOLECULARES DEL RECICLAJE DEL PG Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN PATÓGENOS GRAM NEGATIVOS Y APORTACIÓN DE LA AUTORA	67
4.1.1. DISCUSIÓN	83
4.2 INTRODUCCIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSGLICOSILASA LÍTICA SLTB3 Y APORTACIÓN DE LA AUTORA	87
4.2.1. DISCUSIÓN	105
4.3 INTRODUCCIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSGLICOSILASA LÍTICA MLTF Y APORTACIÓN DE LA AUTORA	107
4.3.1. DISCUSIÓN	141

<a href="#">5. MATERIAL INÉDITO</a>	145
5.1 ANEXO I. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO DE UNIÓN DEL EFECTOR (EBD) DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL AMPR DE <i>P. AERUGINOSA</i>	147
<a href="#">CONCLUSIONES</a>	161
<a href="#">BIBLIOGRAFIA</a>	165

# RESUMEN

En el año 2014 la organización mundial de la salud publicó un informe confirmando que la resistencia de las bacterias a los antibióticos ha alcanzado niveles alarmantes en muchas partes del mundo. Las infecciones causadas por bacterias resistentes son cada vez más frecuentes e invasivas debido al mal uso de los antibióticos y a que las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para sobrevivir a la acción de los antibióticos.

La pared bacteriana presenta la doble característica de ser una estructura vital y exclusiva de estos microorganismos (no existen homólogos en células eucariotas). Es por ello que el diseño o hallazgo de moléculas dirigidas contra la pared constituye una herramienta poderosa y segura para combatir las infecciones bacterianas.

En esta tesis se estudian cuatro enzimas claves en el proceso de reciclaje de la pared celular del patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha resuelto la estructura tridimensional de tres transglicosilasas líticas (LTs): SltB3, Slt y MltF. Estas enzimas son las responsables de romper el enlace glicosídico en el proceso de reciclaje de la pared. Este proceso involucra gran cantidad de enzimas tanto en el periplasma como en el citoplasma y está ligado tanto al mantenimiento de la bacteria como a la resistencia a antibióticos. En este trabajo se analiza también el dominio de unión del efector (EBD) del regulador transcripcional AmpR, que es el encargado de regular la expresión de  $\beta$ -lactamasas y que conecta el reciclaje del peptidoglicano con la resistencia a antibióticos.

La estructura tridimensional de SltB3 presenta cuatro dominios y una conformación anular única. Los estudios de degradación de la pared bacteriana confirman que SltB3 es una enzima mayoritariamente exolítica. Estos estudios, combinados con las estructuras cristalográficas de los complejos, han permitido proponer un mecanismo de reacción para esta enzima. También se han analizado las diferencias existentes en la cavidad catalítica



entre la estructura apo y los complejos que muestra como la enzima adapta su sitio catalítico durante la catálisis.

La estructura tridimensional de la enzima MltF se resolvió por la técnica de dispersión anómala y presenta una arquitectura modular con un módulo regulador análogo a las proteínas de unión a sustrato (del inglés: *substrate binding protein*) y otro módulo responsable de la actividad catalítica. MltF presenta una conformación inactiva que tras la interacción con muropéptidos en el módulo regulador, produce una reorganización de su módulo catalítico que conduce a la activación de la enzima. MltF es la primera estructura de una transglicosilasa que presenta tal regulación alostérica. Aún quedan muchas preguntas abiertas sobre la regulación de esta enzima, pero la aportación de este estudio estructural abre la puerta a la investigación de la regulación de la actividad de las LTs y su implicación en el proceso de reciclaje del PG.

En este trabajo también se presenta un extenso estudio de revisión del estado actual de las enzimas involucradas en el complejo sistema de reciclaje de la pared bacteriana y sus implicaciones en el mecanismo de resistencia a antibióticos.

Como material inédito se presenta la estructura tridimensional de Slt y su complejo con análogo de la pared que nos muestra la interacción de la parte glicánica y la parte peptídica en la cavidad catalítica. Tanto su forma como sus dimensiones apuntan a que Slt formaría parte de un complejo macromolecular. También como material inédito se presenta la estructura del dominio efector de AmpR. Esta estructura ha permitido el análisis estructura-actividad de AmpR y sus implicaciones en la resistencia a antibióticos.

## SUMMARY

Among all of the bacterial resistance complication, gram-negative pathogens are particularly worrying as they are becoming resistant to nearly all drugs. Treating infections of pan-resistant or nearly pan-resistant Gram negative microorganisms is becoming an increasingly common challenge in many hospitals. The nefarious opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* causes nosocomial infections such as pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, and surgical site infections.

About 13% of severe healthcare-associated infections are caused by multidrug resistant strains of *P. aeruginosa*, meaning that almost all classes of antibiotics no longer cure these infections.

The bacterial cell wall is an elastic polymer that defines the shape of the bacterium and prevents cell lysis under high osmotic pressure. Since the cell wall is a unique part of the bacteria it becomes very interesting target.

Cell-wall remodelling and cell-wall biosynthesis have to be coordinated in careful manner. Lytic transglycosylases (LTs) cleave the non-hydrolytic fragmentation of the  $\beta$ -1,4-glycosidic bond between the main components of peptidoglycan (PG): NAM and NAG. The mechanism by which LTs catalyse the fragmentation is unique.

*P. aeruginosa* has at least eleven LTs, this redundancy has been discussed in the literature for many years. It is not clear what is the reason but it is clear that they are essential for the normal cell functioning (Heidrich et al., 2002). The LTs were classified into five families according to their sequence similarity and the identification of certain conserved motifs (Blackburn and Clarke, 2001). Family 1 consists of 5 subfamilies (1A, 1B, 1C, 1D and 1E that include *E. coli* LT Slt70, MltF, MltC, MltD and MltE respectively); Family 2 includes *E. coli* MltA; Family 3 includes *E. coli* MltB; and Family 4 that include bacteriophage lambda proteins (Taylor and Gorazdowska, 1974). Very recently a new family (Family 5) has been proposed for a group of LTs involved in the

sporulation mechanism of the pathogenic bacteria *Bacillus anthracis* and *Clostridium difficile* (Nocadello et al., 2016)

The different LT families have been associated with certain cellular functions. Family 1 seems to be involved in bacterial secretion systems and bacterial conjugation; Family 2 was pointed out to be relevant in the formation of the septum, a process critical in bacterial growth and division; Family 3 was related with flagella and pili formation and sporulation; and Family 4 is involved in phage lysis (Scheurwater et al., 2008). As mentioned above, Family 5 includes LTs that are essential for sporulation in some Gram-negative pathogens.

Herein, we present crystallographic structures of three LTs: SltB3, MltF and Slt from *P. aeruginosa* as well as the crystallographic structure of the effector-binding domain (EBD) from AmpR, the transcriptional regulator of AmpC  $\beta$ -Lactamase.

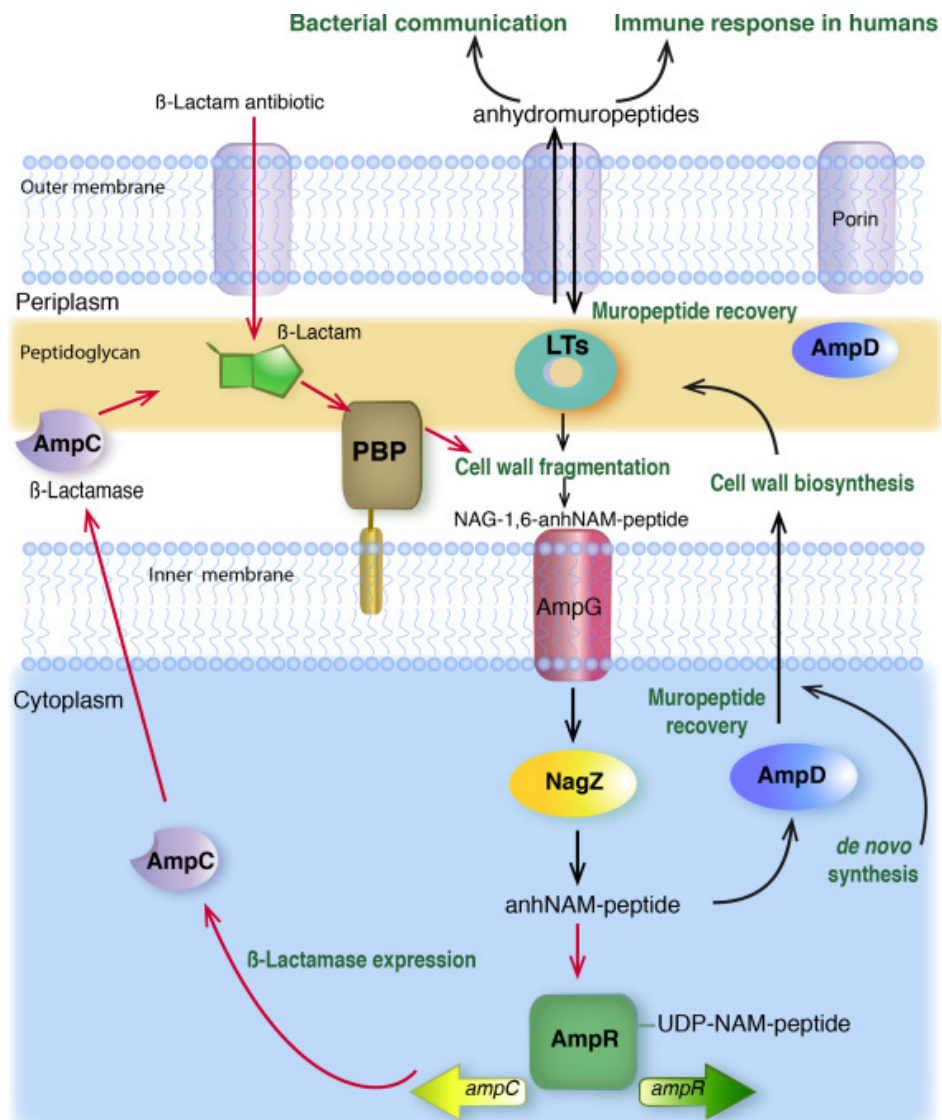
SltB3 is a Family 3 LT, and contains an invariant Glu residue and an unique annular conformation. Structures of SltB3 in complex with substrate and reaction product analogues, together with the LC-MS/MS studies, revealed that SltB3 is an exolytic enzyme capable of processing long oligomeric PG chains between 4-20 sugars in length. The high-resolution structures of the SltB3 complexes provide insights on how the peptidoglycan and its turnover products would be recognized during catalysis. This analysis reveals that the polymeric-linear peptidoglycan substrate threads through the opening of the annulus of the enzyme. Furthermore, we proposed a mechanism for SltB3 reaction.

MltF is a modular LT from *P. aeruginosa*, the three-dimensional structure confirms that the enzyme is organized in two modules, the regulatory domain and the catalytic domain. Occupancy of the regulatory module by a PG-derived-muropeptide causes a dramatic conformational change, which opens the active site for catalysis. The discovery of this allosteric control in MltF catalysis is very important to further studies of the complex enzymatic process of recycling the dynamic PG.

As unpublished material we present the three-dimensional structure of Slt and its complex with anhNAM-pentapeptide. Slt presents a ring-like structure built of three  $\alpha$  rich domains: a N-terminal “U” domain, a “L” domain, and a C-terminal domain. The active site is positioned in a deep groove and has six binding sites labelled -4 to +2. Slt is one of the two LTs (in addition to MltF) where inactivation has been shown to increase the  $\beta$ -lactam susceptibility of the bacterium by unknown mechanisms (Cavallari et al., 2013).

As unreleased material, we present the structure of the regulatory domain of AmpR from *P. aeruginosa*. AmpR is a member of a large family of LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) that encode a N-terminal EBD and a C-terminal DNA-binding domain ((Maddocks and Oyston, 2008). The EBD of AmpR recognizes effector molecules that modulate the transcription of *ampC* (Vadlamani et al., 2015). The EBD has two subdomains and the effector molecule is thought to bind in a pocket between them.

The PG recycling process requires many enzymes to break down the PG. In this work we summarize all of the enzymes that have been solved in recent years. In addition, we present an overview explaining how the recycling process takes place.



**Figure I.** Scheme of all the enzymes involved in the PG recycling process.

# ABREVIATURAS

**AmpC:**  $\beta$ -lactamasa C

**AmpD:** PG amidasa citosólica bacteriana

**AmpDh2:** PG amidasa periplásmica bacteriana

**AmpDh3:** PG amidasa periplásmica bacteriana

**AmpG:** Permeasa

**AmpR:** Proteína reguladora de la expresión de  $\beta$ -lactamasas

**CCD:** Dispositivo de carga acoplada

**CDC:** Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos.

**CM:** Módulo catalítico de MLtF

**CMOS:** Sensor de pixeles activos

**EBD:** Dominio de unión del efector de AmpR

**GlmM:** Enzima encargada de transformar fructosa 6-fosfato en UDP-GlcNAc

**GlmS:** Enzima encargada de transformar fructosa 6-fosfato en UDP-GlcNAc

**GlmU:** Enzima encargada de transformar fructosa 6-fosfato en UDP-GlcNAc

**GT:** Dominio Glicosil transferasa

**HMM-PBPs:** proteína de unión a penicilina de alto peso molecular

**LC:** Cromatografía líquida

**LDts:** L,D transpeptidasas

**LMM-PBPs:** proteína de unión a penicilina de bajo peso molecular

**LTs:** Transglicosilasas lítica

**LysR:** Proteína encargada de formar el lípido I.

**MAD:** Dispersión anómala múltiple

**m-DAP:** *meso*-Diaminopimélico

**MltA:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana A

**MltB :** Transglicosilasa lítica anclada a membrana B

**MltC:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana C

**MltD:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana D

**MltE:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana E

**MltF:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana F

**MltG:** Transglicosilasa lítica anclada a membrana G

**MR:** Reemplazo molecular

**MraY:** Translocasa

**MurA:** Ligasa A

**MurB:** Ligasa B

**MurC-F:** Ligasas C-F

**MurG:** Ligasa G

**MS:** Espectrometría de masas

**NAG:** N-acetilglucosamina

**NagZ:**  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa citosólica bacteriana

**NAM:** Acido N-acetilmurámico

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PBP:** Proteína de unión a penicilina

**PG:** Peptidoglicano

**RM:** Módulo regulador de MltF

**SAD:** Dispersión anómala simple

**SBP:** Proteínas de unión a sustrato

**SltB3:** Transglicosilasa lítica soluble en el periplasma 3

**Slt:** Transglicosilasa lítica soluble

**Slt70:** Transglicosilasa lítica soluble 70

**SltF:** Transglicosilasa lítica soluble F

**TP:** Dominio transpeptidasa

**UDP-NAG:** Uridina difosfato N-acetilglucosamina

# 1. OBJETIVOS





Esta tesis aborda la caracterización del sistema de reciclaje del PG en bacterias Gram negativas y su relación con los mecanismos de resistencia a antibióticos. En particular esta tesis se ha centrado en la caracterización funcional y estructural de tres LTs: SltB3, MltF y Slt; así como del dominio de unión del efector (EBD) del regulador transcripcional AmpR. Todas estas proteínas pertenecen al patógeno oportunista *P. aeruginosa*.

El análisis estructural y funcional de estas enzimas permitirá profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos en los que están involucradas, así como proporcionar detalles moleculares del proceso de reciclaje de la pared del PG y de la resistencia a antibióticos. Dada la importancia de la pared celular para la supervivencia bacteriana, el conocimiento de las bases moleculares de estos procesos puede abrir la vía al desarrollo de nuevas dianas y nuevos antibióticos contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

En concreto los objetivos planteados en este trabajo se pueden resumir como se describe a continuación:

I. Caracterización estructural y funcional de la transglicosilasa lítica soluble SltB3 de *P. aeruginosa*. En particular los objetivos concretos fueron:

- Cristalización y determinación estructural de SltB3 por cristalografía de rayos X.
- Caracterización estructural de los complejos de SltB3 con análogos de la pared del PG.
- Análisis de la estructura-actividad de esta enzima y de las implicaciones para su función biológica *in vivo*.

II. Caracterización estructural y funcional de la transglicosilasa lítica anclada a membrana MltF de *P. aeruginosa*. En particular los objetivos concretos fueron:

- Cristalización y determinación estructural de MltF por cristalografía de rayos X.
- Caracterización estructural de los complejos de MltF con análogos de la pared del PG.

- Identificación de su mecanismo de acción y regulación.
  - Análisis de la estructura-actividad de MltF y de las implicaciones para su función biológica *in vivo*.
- III. Caracterización estructural y funcional de la transglucosilasa lítica soluble Slt de *P. aeruginosa*. En particular los objetivos concretos fueron:
- Cristalización y determinación estructural de Slt por cristalografía de rayos X.
  - Caracterización estructural de los complejos de Slt con análogos de la pared del PG.
  - Análisis de la estructura-actividad de esta enzima y de las implicaciones para su función biológica *in vivo*.
- IV. Caracterización estructural y funcional del dominio de unión del efector del regulador transcripcional AmpR de *P. aeruginosa*. En particular los objetivos concretos fueron:
- Cristalización y determinación estructural de AmpR por cristalografía de rayos X.
  - Determinación estructural de los complejos de AmpR con diferentes activadores y represores de la actividad de AmpR.
  - Identificación de su mecanismo de acción y regulación.

## 2. INTRODUCCIÓN



Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, rectos o mínimamente curvados, aerobios, con sus flagelos polares y quimioorganotrofos (organismos que obtienen su energía de reacciones de oxidación-reducción y que utilizan sustratos orgánicos). Las *Pseudomonas* tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro en un rango de temperatura mesofílico (20-40°C). Cabe destacar la gran cantidad de compuestos que *Pseudomonas* puede utilizar como fuente de energía y carbono. Ciertas especies son patógenas, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa* que está asociada a infecciones de los tractos respiratorios y urinarios. En humanos. *P. aeruginosa* es un parásito oportunista, que ataca especialmente cuando el individuo está inmunodeprimido. Es un patógeno nosocomial que se puede encontrar fácilmente en hospitales y que frecuentemente ataca a enfermos que se encuentran bajo tratamiento por otras causas. *P. aeruginosa* es resistente de forma natural a muchos antibióticos. Es por estas razones por las que esta bacteria está asociada a elevados índices de mortalidad y supone un grave problema para la salud pública.

La resistencia de las bacterias es uno de los principales problemas de la medicina actual. En 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó un informe sobre la resistencia a los antibióticos, en el cual explicaba la grave amenaza que supone para la población mundial. En 2013 el Centro Americano de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) publicó un informe en el que destacaba la importancia que han adquirido a lo largo de los últimos años las bacterias Gram negativas por presentar elevada resistencia a casi todos los fármacos considerados en tratamientos convencionales. Aunque hay ciertos organismos Gram positivos como *Staphylococcus* o *Enterococcus* que también presentan elevada resistencia, organismos Gram negativos tales como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* han adquirido gran importancia estos últimos años.

## 2.1. Estructura extracelular: Membrana celular y pared celular.

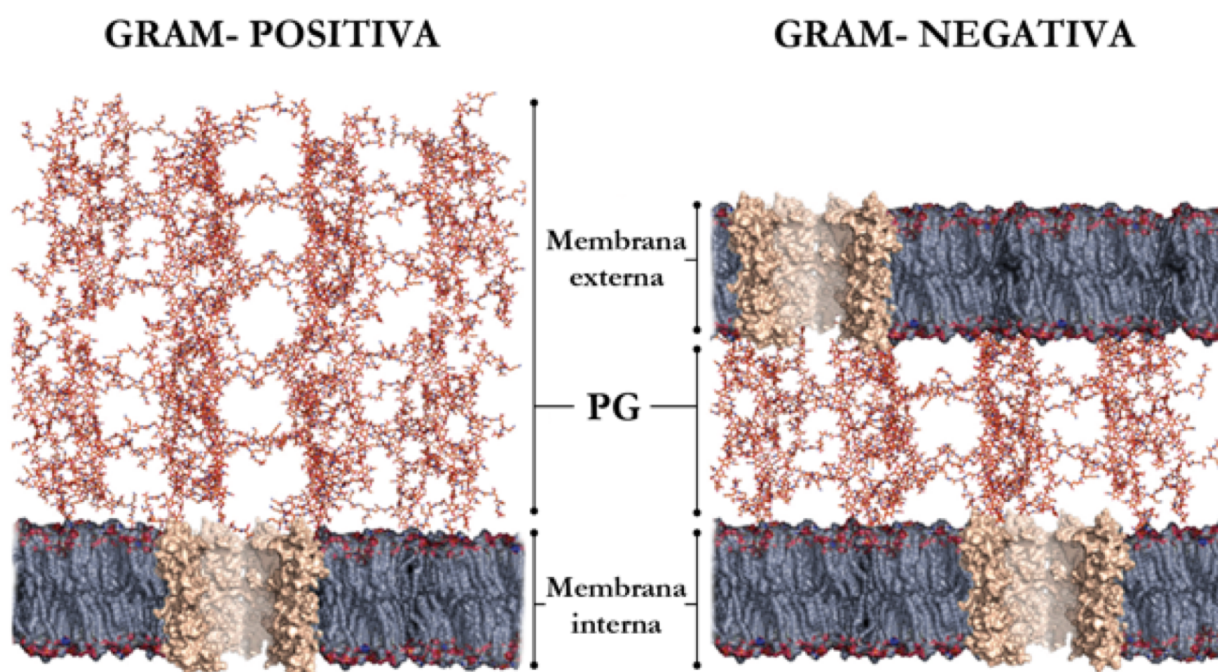
Tanto la membrana celular como la pared celular llevan a cabo dos funciones vitales bien definidas: La membrana permite el transporte de nutrientes y la pared protege a la bacteria de la lisis osmótica.

La membrana es una estructura de aproximadamente 8 nm de espesor que separa el interior (citoplasma) del exterior de la célula, a su vez actúa de barrera seleccionando los metabolitos que se han de incorporar, así como los que se han de excretar. Esta estructura está compuesta por lípidos y proteínas que forman una bicapa donde las regiones hidrofóbicas se encuentran orientadas hacia el interior y las regiones hidrofílicas hacia el exterior. También existen proteínas integrales de membrana que atraviesan la membrana y están implicadas en el transporte y otras funciones. Para acumular sustancias en contra de gradiente se emplean mecanismo de transporte específico.

La pared celular es una capa rígida que protege a la célula de la presión de turgor y le confiere forma. Un elemento fundamental de la pared bacteriana es el peptidoglicano (PG) o mureína que es una capa rígida que está formada por la repetición de dos derivados de azúcares: la N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM). Estos azúcares están unidos por un enlace  $\beta$ -(1,4)-glicosídico. Cada unidad de NAM está conectada a una cadena peptídica corta que puede contener de tres a cinco aminoácidos. Estas cadenas cortas están interconectadas entre sí formando una red tridimensional que recubre la bacteria.

## 2.2. Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

Aunque la mayoría de las procariotas no pueden vivir sin pared celular, algunos organismos como las micoplasmas son capaces de hacerlo porque tienen membranas muy fuertes o porque viven osmóticamente protegidas. A excepción de estas especies, las bacterias se dividen según su pared celular en Gram negativas y Gram positivas. Este nombre hace referencia a la tinción de Gram que tiñe a las bacterias en función de la diferente composición de su estructura extracelular.



**Figura 1.** Diferencias entre la pared bacteriana de organismos Gram positivos y Gram negativos.

En la figura 1 se muestra un esquema de las principales diferencias existentes entre las paredes de ambas bacterias. En bacterias Gram positivas el PG representa el 90% de la pared mientras que en Gram negativas solo el 10% de la pared está formada por mureína. Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa ausente en Gram positivas, el espacio comprendido entre la membrana externa e interna recibe el nombre de espacio periplásmico y es la zona donde se encuentra el PG. Las bacterias Gram positivas poseen



una pared muy gruesa formada por múltiples capas que rodean a la membrana; al no poseer membrana externa, tienen unas cápsulas polisacáridas y unas proteínas de superficie que suplen en cierta manera esta membrana externa. A pesar de que la naturaleza del PG es muy similar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, existen ciertas diferencias relacionadas con la composición del péptido, el grado de cadenas interconectadas y la longitud de las mismas (Reith and Mayer, 2011). Otra diferencia que existe entre ambos tipos de organismos es que en organismos como *E. coli* y otros Gram negativos la cadena de PG no termina en un NAM sino en un 1,6 anhidromurámico. Sin embargo, organismos Gram positivos no contienen esta modificación (Boneca et al., 2000).

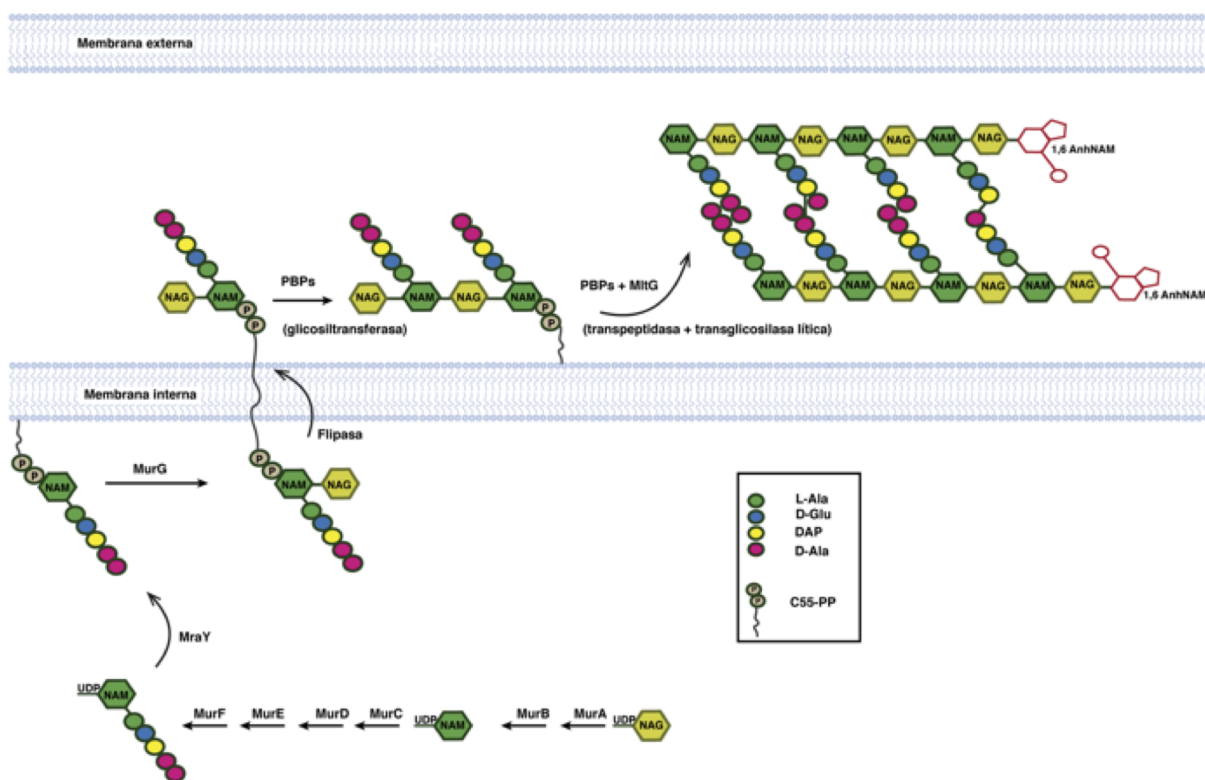
Mientras en las bacterias Gram positivas existe una diversidad muy amplia en la composición del PG, en bacterias Gram negativas la composición del PG parece seguir reglas más uniformes (Reith and Mayer, 2011). La composición global del PG en *P. aeruginosa* es NAG, NAM, ácido glutámico, ácido *meso*-diaminopimélico (m-DAP) y D-Alanina en la proporción 1:1:1:1:1.73. (Mirelman and Nuchamowitz, 1979).

### 2.3. Remodelado de la pared bacteriana

Debido a que la composición de la pared es única de las bacterias y esencial para su supervivencia, tiene gran protagonismo como diana terapéutica. La pared bacteriana está remodelándose constantemente. Tanto la biosíntesis como la degradación de la misma han de ser procesos estrictamente coordinados, ya que cualquier desajuste en alguno de ellos, conllevaría la lisis y posterior muerte celular. En las siguientes secciones se dará una visión general tanto de la biosíntesis como de la degradación de la pared bacteriana.

## 2.4. Biosíntesis de la pared bacteriana

La síntesis de la pared bacteriana (Fig. 2) comienza en el citoplasma con la fructosa-6-fosfato transformándose en UDP-NAG con la intervención secuencial de las enzimas GlmS (sintasa), GlmM (mutasa) y GlmU (transferasa). Posteriormente UDP-NAG se convierte en UDP-NAM-pentapéptido por la actividad secuencial de MurA (enopiruvil transferasa), MurB (reductasa) y MurC-F (ligasas) que son las encargadas de ir añadiendo los péptidos. El siguiente paso lo lleva a cabo la enzima MraY, que cataliza la reacción UDP-NAM-pentapéptido con el undecaprenil pirofosfato para generar el lípido I. El lípido I se une al fragmento NAG para obtener el lípido II a través de la acción de MurG (transferasa) (Johnson et al., 2013). Todos estos pasos ocurren en el citoplasma y existe una proteína que se encarga de transportar el lípido II desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. El lípido II es el disacárido a partir del cual la cadena glicánica del PG empieza crecer (Mohammadi et al, 2011). Las enzimas encargadas de este paso son las PBPs (del inglés *Penicillin Binding Proteins*), que forman nuevos enlaces  $\beta$ -1,4 NAM-NAG en la polimerización del PG.



**Figura 2.** Esquema de la biosíntesis de la pared bacteriana en organismos Gram negativos.

El entrecruzamiento de las cadenas peptídicas que dan lugar a la red tridimensional del peptidoglicano tiene lugar a través de la transpeptidación llevada a cabo por PBPs y LDts (L,D transpeptidasas).

Las PBPs se dividen en dos grupos: HMM-PBPS (proteína de unión a penicilina de alto peso molecular) y LMM-PBPS (proteína de unión a penicilina de bajo peso molecular). Las HMM-PBPs son proteínas que se encuentran ancladas a la membrana y se dividen a su vez en dos clases: las de clase a (aPBPs) que poseen actividad bifuncional transpeptidasa (TP) y glicosiltransferasa (GT) y las de clase b (bPBPs) las cuales solamente presentan actividad TP (Cho et al., 2014).

El dominio transpeptidasa se encarga de entrecruzar las cadenas peptídicas unidas al NAM. En organismos Gram negativos el entrecruzamiento mayoritario se produce entre el grupo carboxilo de la D-Ala en la posición 4, y el grupo amino del m-DAP en la posición 3 de la otra cadena.

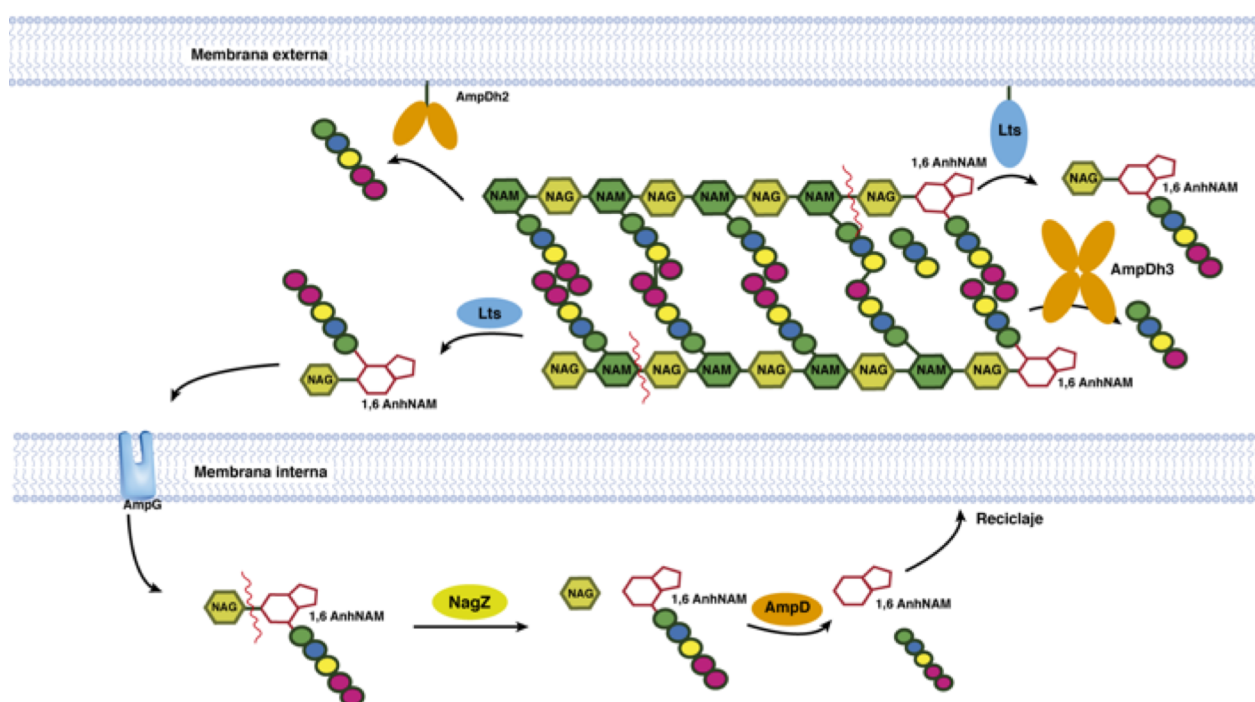
Las LMM-PBPs presentan actividad carboxipeptidasa y regulan el grado de transpeptidación, mediante la eliminación del D-Ala terminal del pentapéptido. Esta actividad controla el grado final de entrecruzamientos de las cadenas glicánicas, ya que las enzimas D-Ala D-Ala transpeptidasas no actúan sobre el tetrapéptido.

Como se ha mencionado en el apartado anterior especies como *E. coli* y *P. aeruginosa* son especies que presentan en el extremo de su cadena glicánica un extremo anhidro-NAM en vez del NAM. Muy recientemente se ha identificado una nueva transglicosilasa lítica que sería responsable de la función terminasa, añadiendo a los extremos de las cadenas glicánicas un azúcar 1,6 anhidro-murámico (Yunck et al, 2016). Por lo tanto, se estaría involucrando por primera vez a una LT en la biosíntesis del PG.

## 2.5. Reciclaje de la pared bacteriana y resistencia a antibióticos

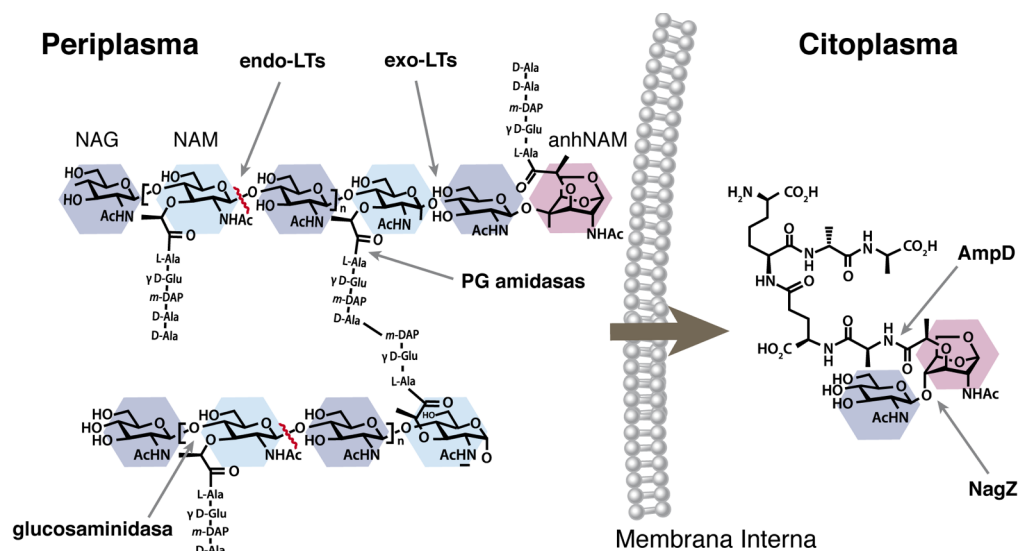
El proceso del reciclaje de la pared del PG (Fig. 3) se inicia con la actividad de varias enzimas que tienen su actividad perfectamente regulada dentro de la bacteria. Dentro de este grupo de enzimas nos encontramos con carboxipeptidasas, que rompen el enlace peptídico D-Ala-D-Ala desde los extremos; endopeptidasas, que rompen el enlace cruzado que forman dos cadenas de PG; las PG amidasas que rompen el enlace NAM-L-Ala liberando la parte peptídica y las transglucosilasas líticas que rompen el enlace glicosídico entre NAM y NAG formando un producto característico, el NAG-AnhNAM. Algunas de estas enzimas se muestran en la figura 4.

El producto resultante es internalizado en el citoplasma a través de una permeasa, AmpG, donde posteriormente es hidrolizada por la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa NagZ, que rompe el enlace glicosídico en el disacárido NAG-AnhNAM.



**Figura 3.** Esquema del reciclaje de la pared bacteriana en organismos Gram negativos.

En circunstancias normales, ausencia de  $\beta$ -lactámicos, los anhidromuropeptidos son finalmente hidrolizados por la PG amidasa AmpD y después de una serie de reacciones estos productos vuelven al ciclo de síntesis de la pared bacteriana.

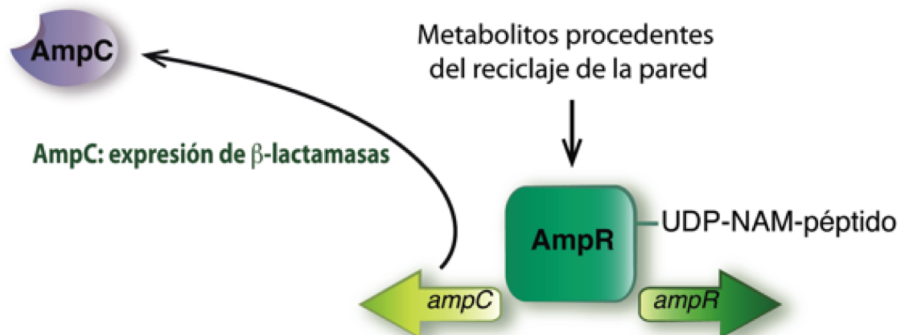


**Figura 4.** Actividad de algunas enzimas involucradas en el proceso de reciclaje de la pared bacteriana.

En presencia de  $\beta$ -lactámicos, sin embargo, estos anhidromuropéptidos se acumulan en el citoplasma y se induce la expresión de AmpC- $\beta$ -lactamasas.

La proteína encargada de regular la expresión de AmpC- $\beta$ -lactamasas es AmpR. AmpR actúa de tal manera que es reprimida por UDP-NAM-pentapéptido y activada por el anhidromuropéptido (Uehara and Park, 2002, Jacobs et al., 1994). De esta forma cuando el ligando UDP-NAM-pentapéptido se une a AmpR actúa como represor de su propio gen. Por el contrario, cuando hay una acumulación del anhidromuropéptido este lo desplaza de manera que AmpR activa el gen *AmpC* y en consecuencia la expresión de AmpC- $\beta$ -lactamasas (Johnson et al., 2013). AmpR es un regulador transcripcional de tipo LysR (LTTRs), que son la familia de reguladores transcripcionales más abundantes en el reino de las células procariotas. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener una estructura conservada con un dominio N-terminal de unión a DNA y un dominio

inductor C-terminal. La figura 5 representa de forma esquemática cómo AmpR lleva a cabo su actividad reguladora.



**Figura 5.** Esquema de la regulación de AmpR.

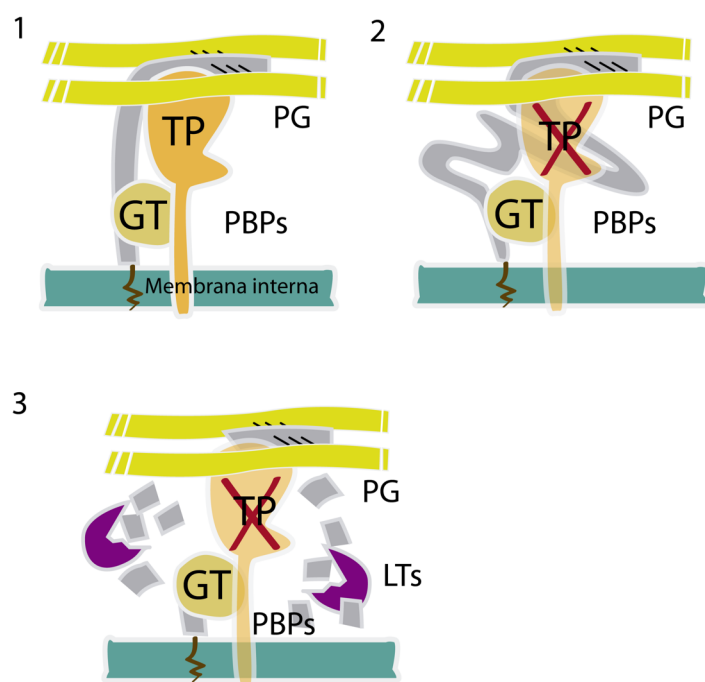
AmpD está relacionada directamente con la resistencia a antibióticos, porque está implicada en la producción de AmpC-β-lactamasas. En el caso concreto de *P. aeruginosa*, a parte del gen *AmpD*, posee dos genes adicionales llamados *ampDh2* y *ampDh3* (Juan et al, 2006). La inactivación de los tres genes parálogos conlleva una producción elevada de β-lactamasas. A diferencia de AmpD, que se encuentra en el citoplasma, AmpDh2 y AmpDh3 son amidasas periplásmicas. La redundancia de estas amidasas en el caso de *P. aeruginosa* ha demostrado ser fundamental tanto para la adquisición de resistencia como para la virulencia (Juan et al, 2006).

## 2.6. Inducción de β-lactamasas

Las β-lactamasas son las enzimas capaces de hidrolizar el anillo β-lactámico, inhabilitando así este tipo de antibióticos. En patógenos Gram negativos, la proteína β-lactamasa AmpC, se encuentra de forma sistemática en la bacteria. La presencia de inhibidores β-lactámicos induce la producción de niveles elevados de AmpC, regulada por la cantidad de muropéptidos acumulados en el citoplasma.

## 2.7. Cómo los antibióticos matan a las bacterias

En condiciones normales los fragmentos que provienen del reciclaje de la pared son reincorporados en la ruta de biosíntesis. Pero en presencia de  $\beta$ -lactámicos el proceso de transpeptidación llevado a cabo por las PBPs se bloquea. Como resultado se produce un desacoplamiento en el entrecruzamiento de las cadenas nacientes del PG, generando un PG que no está entrecruzado. La abundancia de largas cadenas glicánicas no entrecruzadas resulta en una hiperactividad de las LTs incrementando el número de fragmentos NAG-AnhNAM. Este aumento de productos producidos por las LTs provoca un mal funcionamiento en la maquinaria de biosíntesis de la pared causando un ciclo fútil que puede terminar con la muerte de la bacteria (Fig. 6) (Cho et al 2014).

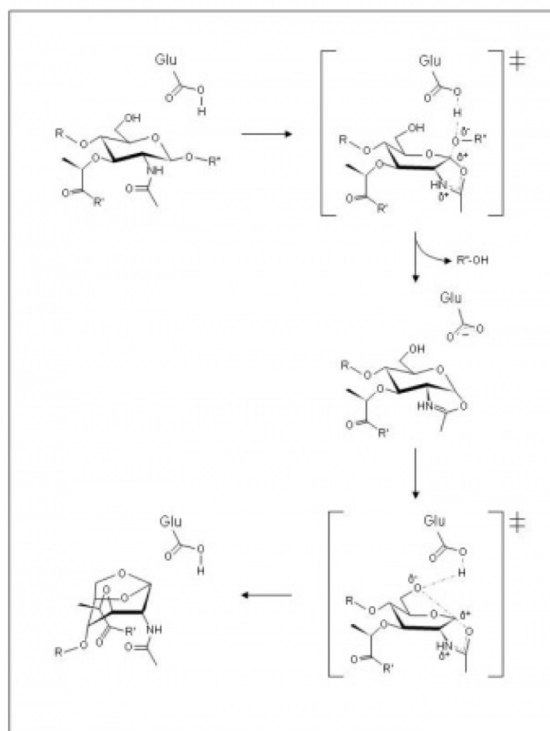


**Figura 6.** Esquema del modo de acción de los antibióticos en bacterias Gram negativas **(1)**. Cadena de PG nascente en condiciones normales y actividad TP y GT de las PBPs. **(2)**. Bloqueo de la actividad TP de las PBPs y consecuente malformación de la cadena nascente de PG. **(3)**. Excesiva actividad de las LTs causando el mal funcionamiento de la maquinaria de biosíntesis. Adaptado de Cho et al 2014

## 2.8. Las Transglicosilasas Líticas

Las LTs rompen el enlace  $\beta$ -(1,4)-glicosídico entre NAM y NAG dando lugar al producto final NAG-AnhNAM que es el metabolito N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina-(1,4)-1,6-anhidro-N-acetil- $\beta$ -D-muramil-L-Ala-D- $\gamma$ -Glu-meso-DAP-(D-Ala)<sub>n</sub>  $n=0,1,2$  siendo  $n=1$ , el tetrapéptido que es el producto más frecuente (Vollmer et al., 2008).

A pesar de las diferencias estructurales y secuenciales, todas las LTs tienen el mismo mecanismo de reacción. La Figura 7 muestra el mecanismo de reacción de las LTs.



**Figura 7.** Mecanismo de reacción de las LTs.

La reacción tiene lugar entre las posiciones -1 y +1 de acuerdo con el consenso establecido previamente para las lisozimas y otras glicosil hidrolasas (Davies & Henrissat, 1995, White & Rose, 1997).

Aunque las lisozimas también rompen el enlace  $\beta$ -(1,4) glicosídico, lo hacen a través de un mecanismo hidrolítico y las LTs sin embargo, lo hacen a través de un mecanismo



intramolecular (no hidrolítico). El mecanismo de reacción, es un mecanismo ácido/base en el cual, el residuo catalítico (Asp/Glu) se protona y actúa como ácido en un primer paso y como base, desprotonándose, en un segundo paso. Esta reacción pasa a través de un intermedio catalítico que es un oxocarbanión. Este proceso conlleva un notable cambio conformacional en el ácido N-acetilmurámico, cuyos sustituyentes pasan de la posición ecuatorial a la axial una vez se ha llevado a cabo la reacción (Suvorov et al., 2008).

Las LTs se pueden encontrar en forma soluble en el periplasma (Slt) o bien ancladas a membrana (Mlt), a través de un segmento transmembrana o por lipidación de una cisteína (Lewenza et al., 2008, Remans et al., 2010, Narita et al., 2007). La primera clasificación de las LTs se realizó en base a una búsqueda a través del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando como secuencias primarias 6 transglicosilasas líticas de *E. coli*, una de *Pseudomonas* y LTs del bacteriófago lambda. Esta clasificación se realizó en base a la similitud de secuencia, así como a la conservación de diferentes motivos (Blackburn and Clarke, 2002). La Familia 1 está constituida por 5 subfamilias (1A, 1B, 1C, 1D y 1E cada una encabezada por las LTs Slt70, MltF, MltC, MltD y MltD respectivamente); la Familia 2 encabezada por MltA, Familia 3 encabezada por MltB y la Familia 4 formada por LTs del bacteriófago lambda (Taylor and Gorazdowska, 1974). Recientemente se han descubierto otras transglicosilasas como RlpA, SltF o MltG de diferentes organismos que no entran dentro de estas cuatro familias

También, se ha descrito muy recientemente una nueva familia, nombrada como Familia 5, asociada a las proteínas que están involucradas en esporulación de patógenos tales como *Bacillus anthracis* o *Clostridium difficile* (Nocadello et al., 2016).

En la Tabla 1 se clasifican las LTs en función de las diferentes familias, según la base de datos CAZy y Pfam. También se muestra si comparten homología o no con el dominio catalítico de la lisozima de ganso (Dominguez-Gil et al., 2016).

**Tabla 1.** Clasificación de las LTs.

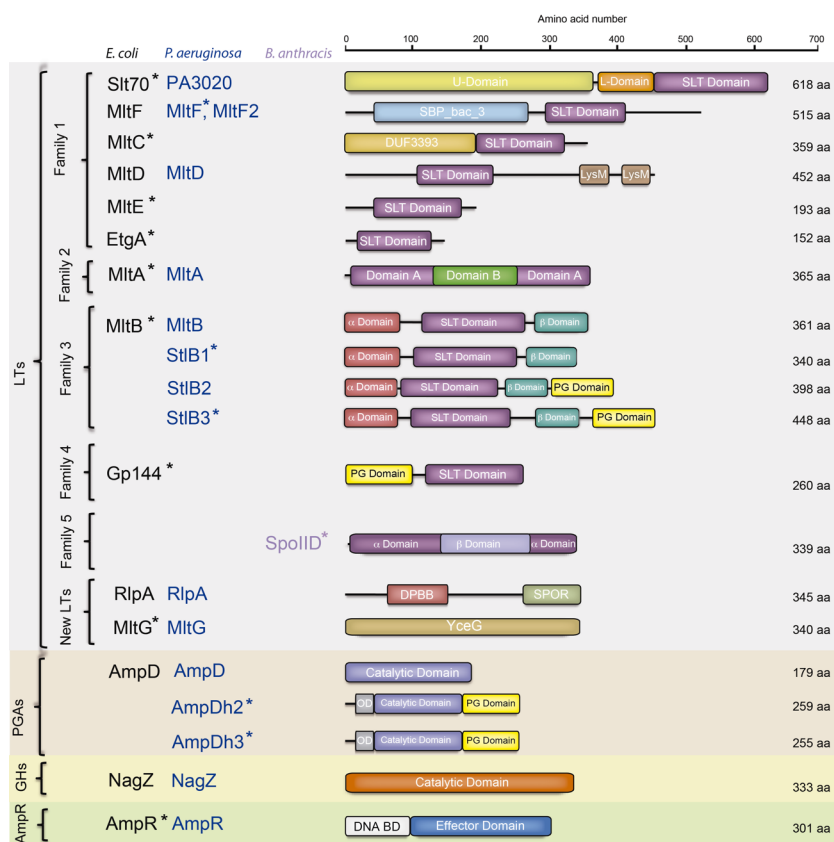
Familia	<i>E. coli</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	CAZy	Pfam	Tipo lisozima de ganso
Familia 1	Slit70 (PA3020), EtgA MltF (MltF y MltF2) MltC MltD (MltD) MltE	GH23	PF01464	Sí
Familia 2	MltA (MltA)	GH102	PF06725	No
Familia 3	MltB (MltB, SlitB1, SlitB2 y SlitB3)	GH103	PF13406	Sí
Familia 4	Endolisina del bacteriófago $\lambda$	GH23	-	Sí
Familia 5	SpoIID ( <i>B. subtilis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>C. difficile</i> )	-	PF08486	No
No clasificada	RlpA (RlpA) MltG (MltG)	- -	PF03330 PF02618	No No

Aunque se desconoce mucho de la función biológica de las LTs las diferentes familias se asociaron a diferentes funciones en la bacteria. La Familia 1 estaría involucrada en sistemas de secreción bacteriana. La Familia 2 en la formación del septo durante la división. La Familia 3 en la formación y esporulación del pili y del flagelo y la Familia 4 estaría involucrada en la lisis del fago (Scheurwater and Clarke, 2008).

## 2.9. Redundancia y supresión de las Lts

Se han identificado hasta 8 LTs en *E. coli* y 11 en *P. aeruginosa*. El hecho de que exista un número tan elevado de proteínas que realizan la misma función dentro de un mismo organismo plantea muchas preguntas sobre la funcionalidad de las mismas, como por

ejemplo si sus funciones son distintas y complementarias o en cambio redundantes y paralelas. Dada la importancia de estas enzimas, la redundancia podría ser una forma de mantener su actividad dentro de la bacteria, ya que esta equivalencia funcional permite la eliminación de una o más LTs sin efecto letal sobre las bacteria. Sin embargo, la supresión de las ocho LTs (en *E. coli*) es letal para la misma (Blackburn and Clarke, 2001, Heidrich et al., 2002, Berger, Schwarz, Holtje, 2002).

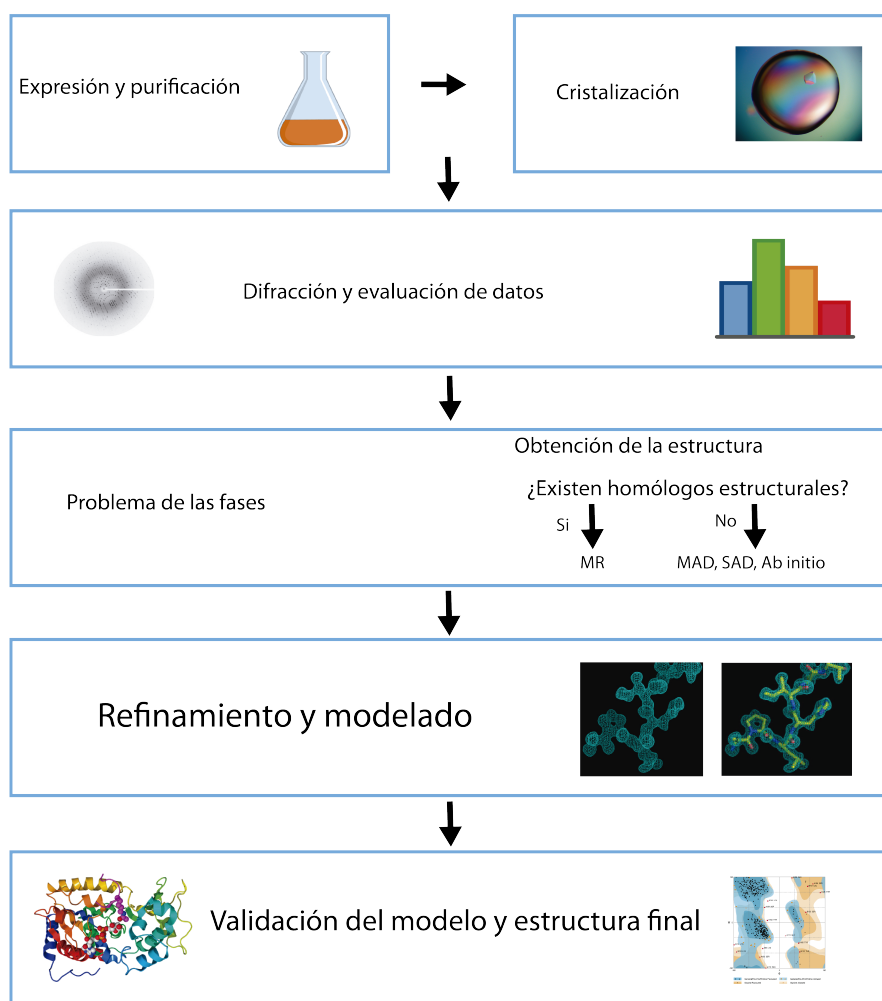


**Figura 8.** Organización modular de las distintas enzimas involucradas en el reciclaje de la pared del PG (Dominguez-Gil et al., 2016)

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS



La biología estructural usa diferentes técnicas para caracterizar las estructuras tridimensionales de las proteínas. Existen tres metodologías fundamentales que permiten la determinación estructural de proteínas: la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la microscopía electrónica. En este trabajo se ha utilizado la primera de ellas para abordar y resolver la estructura tridimensional de diferentes LTs, así como del dominio de unión del efector del regulador transcripcional AmpR.



**Figura 9** Esquema general del proceso de resolución de estructuras moleculares y cristalinas mediante la difracción de rayos X. Para la resolución estructural es necesaria una muestra de proteína pura, una vez se han obtenido cristales de alta calidad se miden en el sincrotrón, posteriormente se lleva a cabo la evaluación de datos y tras varias etapas de refinamiento se obtiene un modelo final.

La cristalografía es la ciencia que se dedica al estudio de los cristales, incluyendo la determinación de su estructura interna. Los cristales son materiales cuyos componentes, átomos, moléculas o iones, están dispuestos de forma ordenada en las tres direcciones del espacio. Las periodicidades de dicho ordenamiento se reconocen experimentalmente cuando los cristales se iluminan con radiaciones de longitud de onda del orden de las distancias interatómicas, propiedad que cumplen los rayos X. La evaluación de este fenómeno, denominado difracción, nos permite determinar la estructura interna tridimensional de los cristales, a nivel atómico, independientemente de que éstos sean material orgánico o inorgánico. La resolución estructural de los cristales de proteína mediante cristalografía de rayos X requiere una serie de procesos que se resumen en la figura 9.

### 3.1. Obtención y purificación de proteínas

Los pasos necesarios para la obtención y purificación de muestras proteicas no son objeto de estudio de esta tesis doctoral y por lo tanto no serán descritos en estas páginas. Simplemente recordaremos que los procesos de clonación, expresión y purificación son pasos indispensables para la obtención de las muestras adecuadas para comenzar un estudio estructural. Cada una de estas etapas seguirá un proceso diferente, dependiendo de las propiedades físico-químicas de la proteína en cuestión.

### 3.2. Cristalización de proteínas

El primer paso para los estudios estructurales de las proteínas mediante difracción de rayos X es conseguir cristales adecuados para someterlos al fenómeno de difracción. Consecuentemente, el objetivo es conseguir que las moléculas se empaqueten entre sí, dando lugar a edificios cristalinos únicos sin, prácticamente, defectos y de un tamaño adecuado al experimento de difracción

#### 3.2.1. Nucleación y crecimiento cristalino

Tras la etapa de purificación, la proteína deberá encontrarse en estado soluble. Para obtener cristales de proteína necesitamos que la muestra se encuentre sobresaturada, lo

que permitirá la nucleación y la posterior adición ordenada de moléculas al núcleo inicial de cristalización. La condición de sobresaturación es un proceso termodinámicamente desfavorable de modo que si se controla el proceso y se evita la precipitación, se puede llegar a obtener cristales a partir de ella. En caso contrario, si se sobrepasan los niveles adecuados de sobresaturación, se suele obtener un precipitado amorfo.

La estrategia para alcanzar la sobresaturación es comenzar con una concentración apropiada de proteína en solución, e ir eliminando solvente de tal forma que vayamos concentrando la muestra de forma lenta y gradual. Para comprender el fenómeno disponemos de los diagramas de fases. En estos diagramas se representa la concentración de proteína frente a una de las variables del experimento, manteniendo el resto fijo (en este caso, figura 10, se ha utilizado la concentración del precipitante). En el proceso de cristalización intervienen muchas variables fundamentales, y las principales son:

- Pureza y concentración de la proteína
- Agentes precipitantes
- pH
- Temperatura
- Existencia de posibles ligandos de la proteína
- Concentración de sales

### 3.2.2. Metodologías de cristalización

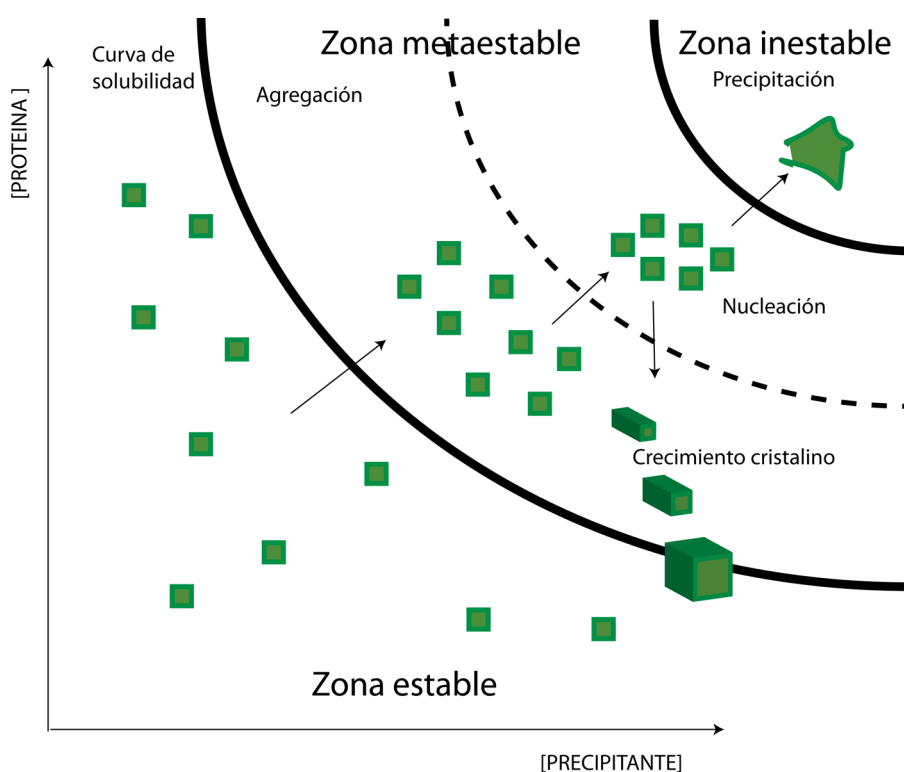
La técnica más común para alcanzar la sobresaturación en una disolución de proteína es la difusión de vapor pero existen otras como difusión de vapor constante y la contradifusión.

#### **Difusión de vapor**

Se trata de alcanzar la sobresaturación en un recinto que está aislado del exterior, y en el cual se mezclan en una misma gota un volumen de proteína y un volumen adecuado de precipitante, y todo ello expuesto sobre un reservorio conteniendo precipitante. Este



sistema cerrado evoluciona por equilibrio de vapor. Como la mezcla de proteína y precipitante en la gota está menos concentrada que la solución de precipitante en el reservorio, la gota tenderá a deshidratarse poco a poco hasta que ambas concentraciones se igualen. Como resultado de este proceso, las concentraciones de la proteína y del precipitante aumentarán lentamente en la gota, y si las condiciones son las adecuadas, se formarán cristales. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio afecta directamente al resultado, y en general son deseables evoluciones lentas del proceso. Dependiendo de la geometría del experimento la gota puede ser “sentada” o “colgante”.



**Figura 10.** Diagrama de fase del proceso de cristalización.

### Difusión de vapor constante

A diferencia de la anterior, esta técnica requiere mínimas cantidades de solución de precipitante. En este caso se mezclan las mismas cantidades de solución de proteína y de precipitante, y la mezcla se cubre con un aceite especial que permite la evaporación a un

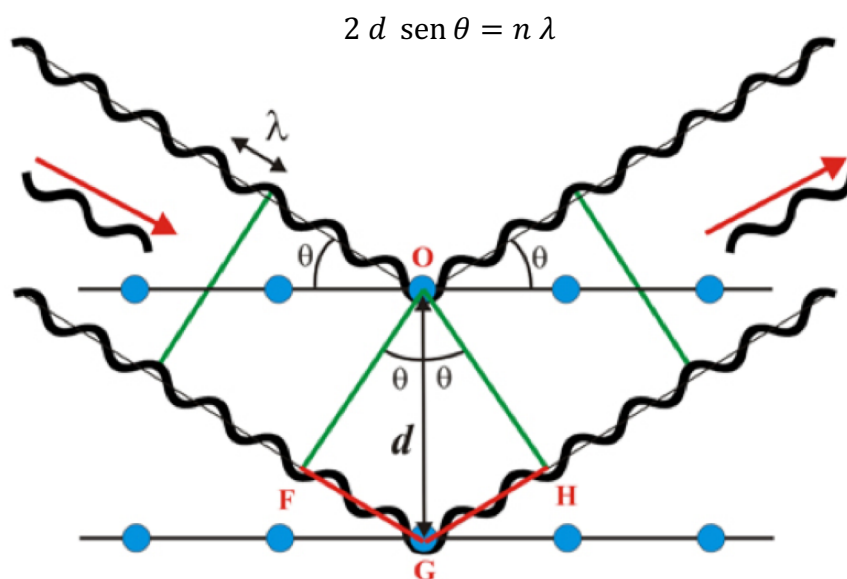
ritmo muy lento. Mediante este procedimiento nunca se llega a alcanzar el equilibrio, ya que se trata de un proceso constante, con lo cual los cristales deben extraerse de la gota antes de que la misma se evapore demasiado.

### **Contradifusión**

En este caso la proteína se vierte directamente en el extremo de un medio poroso, como por ejemplo un capilar relleno de un gel de agarosa, y el precipitante se sitúa en el extremo contrario. Este procedimiento permite ensayar distintas condiciones de cristalización en un solo experimento, acercándose de manera progresiva a las condiciones óptimas de saturación. En la práctica, esto significa que mientras se difunde a través del gel la solución con la proteína, va modificando su saturación y, en su caso, cristalizando progresivamente, de forma que en un mismo capilar podrán crecer cristales que irán desde formas amorfas hasta perfectas (Ng et al., 2003).

### **3.3. Rayos X y difracción**

Los rayos X son una radiación electromagnética con una longitud de onda cercana a las distancias interatómicas en la materia, que son del orden de  $10^{-10}$  m ( $10^{-8}$  cm = 0.1 nm), magnitud que se conoce como 1 Å (Ångström). Las variaciones del campo eléctrico asociado a la radiación X incidente sobre los átomos provoca la resonancia de los electrones, lo que convierte a los átomos en emisores de rayos X, que a su vez interaccionan entre sí, dando lugar a una dispersión generalizada de los rayos X incidentes. Cuando los átomos y/o moléculas están ordenados de forma repetitiva, tal como ocurre en los cristales, esta dispersión se convierte en una propagación cooperativa (constructiva y/o destructiva), que se denomina difracción. En medios periódicos este fenómeno es interpretable en términos geométricos. En el caso de que se dé una interferencia constructiva se cumple la ley de *Bragg*, la cual describe el fenómeno de la difracción (Fig. 11.).



**Figura 11.** Ley de Bragg. Cuando los frentes de ondas emergentes tras la reflexión están en fase, se observará intensidad, es decir se estará cumpliendo la ley de Bragg.

### 3.4. Fuentes de radiación X

Los rayos X usados en cristalografía se pueden obtener en los laboratorios mediante los denominados generadores. Estos equipos disponen de una fuente de alta tensión (unos 50 kV), que se suministra al llamado tubo de rayos X, donde se produce la radiación. Dicho voltaje se suministra como diferencia de potencial entre un filamento incandescente (por el que se hace pasar una corriente de bajo voltaje e intensidad) y un metal puro (normalmente cobre o molibdeno), estableciéndose entre ambos una corriente de unos 30 mA de electrones libres. Desde el filamento incandescente (cargado negativamente) saltan electrones hacia el ánodo (cargado positivamente) provocando en los átomos de este último, una reorganización electrónica en sus niveles de energía, lo que se traduce en la emisión de rayos X. Este es un proceso en el que se genera mucho calor, por lo que los tubos de rayos X deben estar muy refrigerados. Una alternativa a los tubos convencionales son los llamados generadores de ánodo rotatorio, en los cuales el ánodo, en forma de cilindro, se mantiene con un giro continuo, consiguiendo con ello que la incidencia de los electrones del filamento se reparta por la superficie del cilindro y así se puedan obtener mayores potencias de rayos X. El generador de ánodo rotatorio

utilizado en esta tesis fue de la marca Bruker, modelo MicroStar de 2.7 kW con microfoco de 100  $\mu\text{m}$



**Figura 12.** Arriba, generador de ánodo rotatorio utilizado en esta tesis y abajo sincrotrón ESRF, Grenoble, Francia.

Sin embargo, las fuentes de rayos X más usadas, y eficaces en los estudios estructurales de proteínas, son los sincrotrones. Una instalación de radiación sincrotrón integra un acelerador de electrones lineal en el que se inyectan paquetes de electrones que sufren una aceleración inicial, un anillo de aceleración que eleva la energía de dichos paquetes hasta valores cercanos a los 6 GeV, un anillo de almacenamiento de varios metros de diámetro por el que viajan los paquetes de electrones de alta energía y finalmente una serie de líneas experimentales en posición tangencial al anillo de almacenamiento. El cambio de trayectoria de los electrones, para obligarlos a circular en

el anillo de almacenamiento, se consigue mediante campos magnéticos. Y es en ese momento, en el cambio de dirección, cuando los electrones emiten una radiación muy energética denominada radiación sincrotrón. Esta radiación, compuesta por un continuo de longitudes de onda, se filtra mediante monocromadores para seleccionar la longitud de onda adecuada al estudio cristalográfico. El uso de la radiación X procedente de los sincrotrones presenta dos ventajas fundamentales frente a las instalaciones tradicionales de ánodos rotatorios; la intensidad es del orden de  $10^{20}$  veces mayor, y su longitud de onda es sintonizable, lo cual es una ventaja muy importante para la resolución estructural. En nuestros estudios hemos utilizado las fuentes de radiación sincrotrón ALBA y ESRF.

### 3.5. Difracción de rayos X en los cristales

La difracción es un fenómeno que se caracteriza por la dispersión de las ondas X al encontrar dispersores ordenados y repetidos en el espacio. Cada átomo ( $j$ ) dispersa la radiación X en función del denominado “factor de dispersión atómico” ( $f_j$ ) que depende del número de electrones del átomo y de la dirección de dispersión que se considere. De este modo, la dispersión de cada átomo se suma o resta con la provocada por los restantes átomos de la celdilla, dando lugar a la difracción, medible por un parámetro fundamental que se denomina “factor de estructura”:

$$F(hkl) = \sum_{j=0}^n f_j e^{2\pi i[hx+ky+lz]}$$

**Fórmula 1.** Factor de estructura de la reflexión hkl.

en donde  $hkl$  es un triplete de números enteros que representan las direcciones de los haces difractados, y  $xyz$  las coordenadas de cada átomo de la estructura. Los factores

de estructura son magnitudes vectoriales que vienen descritas por su módulo y su fase. Los módulos de estas magnitudes, uno por cada haz difractado, son proporcionales a las intensidades de difracción, que son magnitudes directamente medibles en los patrones de difracción experimental.

Los cristales pueden describirse mediante unidades repetidas periódicamente en las tres direcciones del espacio y definidas según sus ejes ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) y sus ángulos interaxiales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Dichas unidades repetitivas se denominan celdillas elementales, de tal modo que conocer la estructura interna de un cristal se reduce a conocer el interior de una de estas celdillas. Además de esta propiedad fundamental de la periodicidad de las celdillas, en el interior de las mismas pueden existir elementos de simetría (ejes de rotación, planos de simetría o centro de inversión) que hacen que los átomos, moléculas o iones se repitan a sí mismos en otros lugares, llenando la celdilla elemental. Esta característica de los cristales permite pues reducir a un mínimo la dificultad para describir la estructura interna de un cristal, pues basta describir las posiciones atómicas de la unidad mínima (unidad asimétrica) que por simetría se repite en el interior de la celdilla elemental para reproducir el contenido total de la celdilla. Por último, el apilamiento de las celdillas elementales en las tres direcciones del espacio nos ofrecerá la estructura total del cristal. Existen 230 modos diferentes (grupos espaciales) de empaquetamiento de los átomos y moléculas en los cristales, pero en las proteínas éstos se reducen a 65, ya que determinados elementos de simetría como los centros de inversión no pueden existir en estas moléculas.

### 3.6. Determinación de la estructura tridimensional de las proteínas

Las posiciones atómicas en los cristales se describen mediante coordenadas fraccionarias referidas a los tres ejes fundamentales de la celdilla elemental. Las posiciones atómicas corresponden a los máximos de la denominada “función de densidad electrónica”,  $\rho(xyz)$ , definida para cada punto de coordenadas  $(xyz)$  en el interior de la celdilla elemental.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl}^{+\infty}_{-\infty} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

**Fórmula 2.** Función de densidad electrónica. V es el volumen de la celda unidad x, y, z las coordenadas de cualquier punto del espacio, hkl los índices de Miller,  $|F(hkl)|$  el módulo del factor de estructura y  $\phi(hkl)$  su correspondiente fase.

Matemáticamente, la función de densidad electrónica se puede definir como la transformada de Fourier de los factores de estructura. Sin embargo, de estas magnitudes sólo conocemos sus módulos  $|F(hkl)|$ , quedando desconocidas sus fases ( $\phi$ ).

Esta es la dificultad fundamental que se plantea en el proceso de la resolución de una estructura cristalina mediante difracción de rayos X. Es el conflicto conocido como problema de las fases, que podemos equiparar a intentar resolver un puzzle con tantas piezas como haces de difracción, pero con piezas sin dibujo, o incluso sin perfil definido. La resolución de este problema se ilustrará en otro apartado ulterior.

Aunque ya se ha planteado el problema fundamental de la resolución estructural mediante cristalografía, hay algunos pasos previos que sí son solubles mediante un cuidadoso trabajo experimental. Nos referimos a la detección del patrón de difracción y su análisis preliminar, que consta de:

- Selección y montaje de un cristal adecuado para el proceso de difracción.
- Registro del patrón de difracción en condiciones de baja temperatura (del orden de 100 K), obteniendo una imagen del diagrama de difracción por cada pequeño giro del cristal.
- Procesado de datos, que consiste en varios pasos sucesivos:
  - Indexación de cada reflexión, y en consecuencia la detección de los parámetros reticulares (constantes de celdilla). Durante la indexación se obtiene además una estimación de la denominada mosaicidad cristalina, que

indica el grado de homogeneidad del cristal en lo que a microdominios cristalinos se refiere.

- Evaluación de la intensidad de cada haz difractado mediante la denominada integración, que consiste en sumar las intensidades de cada pixel contenido en el área que ocupa cada haz difractado. Además, los haces difractados pueden haber sido detectados parcialmente en varios diagramas sucesivos. Durante la integración se estima también el error asociado (desviación estándar relativa) a cada intensidad difractada. Tras este paso se procede al escalado de los datos, que corresponde al proceso en el cual todas las intensidades se ponen en la misma escala, ya que durante el tiempo del experimento de difracción el cristal ha podido dañarse, o el haz incidente puede haber cambiado ligeramente de intensidad.
- Determinación de los elementos de simetría que muestra el patrón de difracción, para de ahí deducir la simetría del cristal (grupo espacial).

Algunos criterios de la calidad del procesado de los datos de difracción son:

- $R_{sym}$ : Indica las diferencias en la intensidad de las reflexiones relacionadas por simetría. Un valor global de menos de un 10% de  $R_{sym}$  indica un buen conjunto de datos. El  $R_{pim}$  es una variante donde se pondera este valor en función de la redundancia en la medida de las reflexiones.
- $I/\sigma(I)$ : Representa el valor de la razón entre la intensidad de la señal y el ruido de fondo, estimado como la desviación estándar de la intensidad. Se consideran datos satisfactorios cuando se obtienen valores de este cociente superiores a 2 para la última capa de resolución (intensidades recogidas a ángulos de difracción más altos). Actualmente los detectores han mejorado sustancialmente por lo tanto serían aceptables valores incluso más bajos. Siempre que el coeficiente de correlación  $CC1/2$  (ver debajo) lo permita.
- Redundancia: Indica el número de veces en promedio que cada reflexión ha sido medida. Una redundancia alta permite disminuir los errores asociados a cada reflexión.



- Completitud: Indica el porcentaje de reflexiones medidas en relación a todas las posibles. Este número debería oscilar entre un 90% y un 100% para todo el experimento, y de al menos un 80% para la última capa de resolución (los haces difractados en la zona de mayores ángulos de difracción).
- CC1/2 y CC\*: Estos parámetros están basados en el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, que determina con mayor precisión la calidad de los datos de difracción (Karplus and Diederichs, 2012). Si se divide el conjunto de datos en dos mitades, eligiendo de forma aleatoria las reflexiones que pertenecen a cada nuevo subconjunto, los errores obtenidos en cada subconjunto también serán aleatorios y su magnitud será similar. El CC1/2 es el coeficiente de correlación entre las reflexiones de ambos subconjuntos. Esta correlación deberá ser elevada para las capas de menor resolución, ya que éstas contienen las reflexiones mejor evaluadas, mientras que en las capas de alta resolución las señales se pueden confundir con el ruido de fondo y la correlación será menor. El otro parámetro (CC\*) muestra la correlación real entre los datos observados y las intensidades reales desconocidas y cuya expresión viene dada por:

$$CC^* = \frac{2CC_{1/2}}{1 + 2CC_{1/2}}$$

**Fórmula 3.** CC\*. Correlación real entre los datos observados y las intensidades reales desconocidas.

### 3.7. Resolución del problema de las fases

Tal como se ha mencionado anteriormente, para poder calcular la función de densidad electrónica (Fórmula 2) y por lo tanto para poder saber determinar las posiciones de los átomos de la estructura, es necesario conocer el módulo y la fase de cada factor de estructura. Pero habida cuenta de que la información correspondiente a la fase se pierde durante el experimento de difracción, la cristalografía utiliza estrategias específicas para resolver este problema. Una vez conocidas unas fases iniciales, existen

procedimientos de mejora de las mismas, de modo que nos conduzcan hasta las coordenadas atómicas de un modelo final fidedigno (Taylor, 2010).

Para resolver el problema de las fases en cristalografía de macromoléculas los métodos más utilizados son:

#### 3.7.1. Reemplazo molecular (*MR: Molecular Replacement*)

Este método requiere del conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína homóloga, y se fundamenta en el hecho de que proteínas homólogas tienen un plegamiento similar (Rossmann, 2001). El problema consiste en transferir la estructura molecular de la proteína conocida, desde su propio empaquetamiento cristalino hasta el cristal de la proteína con estructura desconocida. El posicionamiento de la molécula conocida en la celdilla de la proteína desconocida requiere determinar su correcta orientación y su posición precisa mediante el cálculo de las funciones de rotación y traslación. La calidad de las soluciones de estas funciones se expresa mediante los coeficientes de correlación entre las funciones de Patterson experimental y calculada con la proteína conocida. Un coeficiente de correlación alto entre dichas funciones equivale a un buen acuerdo entre el patrón de difracción experimental y el calculado con la proteína conocida. Una vez orientada y trasladada convenientemente la molécula conocida, se calcula un mapa de densidad electrónica usando los módulos de los factores de estructura experimentales y las fases obtenidas del modelo homólogo.

#### 3.7.2. Reemplazo isomorfo múltiple (*MIR: Multiple Isomorphous Replacement*)

El método MIR consiste en introducir en la celdilla cristalina, átomos que sean grandes dispersores de los rayos X (átomos con números atómicos elevados), pero la dificultad estriba en el hecho de que los átomos introducidos no deben distorsionar la estructura cristalina de la proteína nativa, es decir, que los cristales así obtenidos deben ser isomorfos con los de la proteína nativa.

En la práctica, este reemplazo atómico se lleva a cabo difundiendo complejos de metales pesados a través de los canales que poseen los cristales de proteína, y en donde

normalmente existen cadenas laterales de aminoácidos con capacidad de coordinar a los átomos metálicos (por ejemplo, grupos SH de las cisteínas). En el caso de las metaloproteínas es posible reemplazar sus metales endógenos por otros más pesados (por ejemplo, Zn por Hg, Ca por Sm, etc.).

La obtención de las fases mediante esta técnica está igualmente basada en la metodología de Patterson. Esta técnica ha caído en cierto desuso durante los últimos años.

### 3.7.3. Difracción anómala múltiple (*MAD: Multi-wavelength Anomalous Diffraction*) / *SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction)*

Los cambios que se provocan en la intensidad de la difracción al introducir átomos pesados en los cristales de proteína se pueden considerar como modificaciones químicas de la difracción. De modo análogo, se pueden provocar cambios en las intensidades de la difracción modificando las propiedades físicas de los átomos. Así, cuando la radiación X incidente tiene una frecuencia próxima a la frecuencia natural de oscilación de los electrones de un determinado átomo, se produce la denominada dispersión anómala, que modifica el factor de dispersión atómico ( $f_j$ ).

El método MAD requiere la medida de los datos de difracción de un cristal de la proteína (que contenga un dispersor anómalo fuerte) usando radiaciones de tres distintas longitudes de onda que modifican dos de las componentes del factor atómico de dispersión ( $f_j$ ). Combinando estos conjuntos de datos de difracción, y en concreto analizando las diferencias entre ellos, es posible calcular la distribución de amplitudes y fases que generan los dispersores anómalos. El uso posterior de las fases generadas por estos dispersores anómalos como una primera aproximación a las fases globales, permite calcular la densidad electrónica para toda la celdilla. En general, en la práctica no es necesario introducir átomos aislados, como dispersores anómalos, en el cristal de proteína. Hoy en día es relativamente sencillo obtener proteínas recombinantes en las que los residuos de metionina están reemplazados por selenio-metioninas. El selenio, e

incluso el azufre de la metionina, o de la cisteína, son dispersores anómalos adecuados para llevar a cabo un experimento MAD. En el método SAD sólo se utilizan los datos recogidos a una sola longitud de onda, aquella en donde se maximiza una de las componentes del factor de dispersión del átomo dispersor (Karle, 1991).

#### 3.7.4. Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio*, conocidos como métodos directos, tratan de obtener información de las fases directamente desde los módulos de los factores de estructura, usando relaciones de probabilidad. Estas metodologías, que se usan con mucho éxito en moléculas de tamaño pequeño-mediano (de hasta un centenar de átomos) y con patrones de difracción de muy alta resolución, se han demostrado hasta ahora poco eficaces en el caso de las macromoléculas biológicas. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una nueva metodología incluida en un programa informático denominado ARCIMBOLDO (Rodríguez et al., 2012) que puede considerarse como un método *ab initio*, pues se basa exclusivamente en la combinación de la ubicación de pequeños fragmentos de modelo, como pequeñas  $\alpha$ -hélices, que tratan de obtener fases iniciales al localizar dichos fragmentos en la estructura desconocida mediante el uso de otros programas adicionales como PHASER ((McCoy et al., 2007) y SHELXE (Sheldrick, 2010).

En este trabajo se presentan cuatro estructuras resueltas por diferentes métodos: SltB3 y AmpR se resolvieron por el método del reemplazo molecular, MltF por el método SAD y Slt utilizando el programa ARCIMBOLDO.

### 3.8. Refinamiento estructural y modelo final

Una vez resuelto el problema inicial de las fases, utilizando alguno de los métodos descritos, en general se puede calcular un primer mapa de densidad electrónica. El modelo estructural que inicialmente se observa en dicho mapa no suele ser completo y puede ser poco predictivo para las zonas estructurales todavía no localizadas. Ello se demuestra también por el hecho de que el patrón de difracción calculado con el modelo

estructural parcial muestra un elevado factor de desacuerdo ( $R$ , ecuación 4) con el patrón de difracción experimental. Para completar el modelo estructural se hace necesario mejorar las fases, y para ello es necesario hacer uso de metodologías cristalográficas adicionales, basadas en conocimientos estructurales previos seguidos de una cuidadosa reconstrucción manual del modelo a partir del mapa de densidad electrónica y concluyendo con la aplicación de refinamientos matemáticos complejos que deberán reducir la discrepancia entre los módulos de los factores de estructura observados y calculados con el modelo obtenido, a valores menores de un 25%.

$$R = \frac{\sum_{hkl} [|F_{obs}| - |F_{cal}|]}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

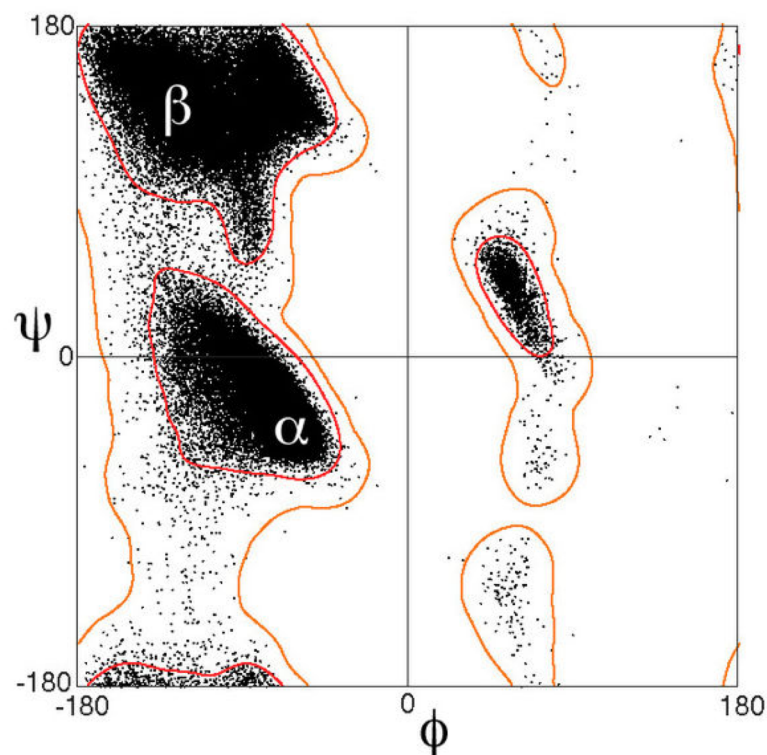
**Fórmula 4.** Factor de desacuerdo  $R$ .

Existen diferentes tipos de refinamiento matemático en función de la etapa en la que nos encontremos. En las primeras etapas se utiliza el templado simulado (*simulated annealing*) y el refinamiento de cuerpo rígido (*rigid body*). Más tarde se aplican métodos probabilísticos de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*). En general, estos ajustes matemáticos implican pequeños cambios en las coordenadas atómicas ( $xyz$ ) y en el factor de agitación térmica isotrópica ( $B$ ) que se asigna a cada átomo, lo que da lugar al denominado modelo estructural final.

### 3.9. Validación del modelo

Existen una serie de valores que nos ayudan a evaluar la fiabilidad del modelo final. Las distancias, los ángulos de enlace, y los ángulos de torsión en las cadenas polipeptídicas han de estar comprendidos dentro de los intervalos estereoquímicos aceptables. La bondad del ángulo de torsión en el enlace peptídico se controla mediante el denominado diagrama de Ramachandran (Joosten et al., 2009), que contiene la distribución de dichos ángulos de torsión ( $\psi$ ,  $\Phi$ ) dependiendo de si se trata de  $\alpha$ -helices o  $\beta$ -láminas. Los programas actuales presentan además otras herramientas que permiten

comparar la estructura obtenida con las determinadas y depositadas en el PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) para el mismo orden de resolución que la de interés. De este modo se puede garantizar que la estructura resultante proporcione un modelo estructural fiable y ajustado a los datos de difracción obtenidos experimentalmente.



**Figura 13.** Validación estructural. Diagrama de Ramachandran donde se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos de torsión de los enlaces peptídicos que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas.



## 4. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN





## 4.1 Mecanismos moleculares del reciclaje del PG y resistencia a antibióticos en patógenos Gram negativos y aportación de la autora.

El proceso de remodelado de la pared bacteriana está estrictamente regulado garantizando así, la supervivencia de la bacteria y además en muchos casos está conectado directamente con la resistencia a antibióticos.

Los fragmentos producidos en el remodelado de la pared son reciclados, actúan como mensajeros en procesos de comunicación bacteriana y regulan la producción de  $\beta$ -lactamasas.

Este trabajo tiene como objetivo actualizar la información sobre los mecanismos moleculares que intervienen en estos procesos y describir la información estructural sobre las maquinarias relacionadas en el proceso de reciclaje de la pared bacteriana de organismos Gram negativos. Teniendo en cuenta el aumento en la frecuencia y la propagación de organismos patógenos multiresistentes, la información estructural de las principales enzimas involucradas en el proceso de reciclaje abre una vía para el diseño de nuevos fármacos interrumpiendo así la comunicación celular en la ruta reciclaje-resistencia

En este trabajo, la autora ha realizado el análisis, la caracterización estructural y funcional de las enzimas involucradas en el reciclaje de la pared del peptidoglicano.





Contents lists available at ScienceDirect

## Drug Resistance Updates

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/drug](http://www.elsevier.com/locate/drug)

# Renew or die: The molecular mechanisms of peptidoglycan recycling and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens



Teresa Domínguez-Gil, Rafael Molina, Martín Alcorlo, Juan A. Hermoso\*

Department of Crystallography and Structural Biology, Inst. Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Antibiotic resistance  
Cell-wall recycling  
Gram-negative bacteria  
Lytic transglycosylases  
Peptidoglycan amidases  
Structural biology

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the most serious health threats. Cell-wall remodeling processes are tightly regulated to warrant bacterial survival and in some cases are directly linked to antibiotic resistance. Remodeling produces cell-wall fragments that are recycled but can also act as messengers for bacterial communication, as effector molecules in immune response and as signaling molecules triggering antibiotic resistance. This review is intended to provide state-of-the-art information about the molecular mechanisms governing this process and gather structural information of the different macromolecular machineries involved in peptidoglycan recycling in Gram-negative bacteria. The growing body of literature on the 3D structures of the corresponding macromolecules reveals an extraordinary complexity. Considering the increasing incidence and widespread emergence of Gram-negative multidrug-resistant pathogens in clinics, structural information on the main actors of the recycling process paves the way for designing novel antibiotics disrupting cellular communication in the recycling-resistance pathway.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

## 1. Introduction

"Antimicrobial resistance in a wide range of infectious agents is a growing public health threat of broad concern to countries and multiple sectors. Increasingly, governments around the world are beginning to pay attention to a problem so serious that it threatens the achievements of modern medicine. A post-antibiotic era – in which common infections and minor injuries can kill – far from being an apocalyptic fantasy, is instead a very real possibility for the 21st century" (WHO, 2014). This paragraph, elaborated by the World Health Organization, very precisely summarizes the present situation: infections from resistant bacteria are now too common, and some pathogens have even become resistant to multiple types

or classes of antibiotics. Infectious diseases are now a leading cause of death worldwide. The increasing incidence and widespread emergence of pathogens that are resistant to antibiotics have reversed advances in the treatment of many infections (Fears and ter Meulen, 2014). Gram-negative bacteria are among the most problematic microorganisms due to their increasing resistance to antibiotics. These include a multitude of organisms, some of which cause respiratory problems such as *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, urinary-tract infections caused by *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* whereas *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi* cause gastrointestinal problems. In addition, other bacteria such as *P. aeruginosa* are associated with hospital-acquired infections like meningitis and pneumonia in hospital intensive-care units.

It is estimated that in the European Union, antibacterial resistance causes more than 25,000 deaths per year, with estimated costs of €1500 million per year (WHO, 2014) and in the United States, at least 23,000 deaths occur every year due to antibiotic-resistant infections (Prevention, 2013). Understanding of the mechanisms that bacteria have evolved to survive in the presence of antibiotics is a primary requisite to tackle the problem of antibiotic resistance. This review focuses on the structural biology of the cell-wall recycling process in G(–) pathogens, a process that involves different lytic and transport machineries critical for bacterial fitness and antibiotic resistance.

**Abbreviations:** AnhNAM, anhydro N-acetylmuramic; CDD, Conserved Domain Database; DPBB, double-psi β barrel; EBD, effector-binding domain; EGV, endoglucanase V; G(–), Gram-negative; GH, glycosylhydrolase; LC, liquid chromatography; LT, lytic transglycosylases; LTTR, LysR-type transcriptional regulators; MS, mass spectrometry; Mlt, membrane-bound lytic transglycosylase; NAG, N-acetylglucosamine; NAG3, N,N',N''-tri-acetyl-chitotriose; NAM, N-acetylmuramic; NMR, nuclear magnetic resonance; PBP, penicillin-binding protein; PDB, Protein Data Bank; PG, peptidoglycan; PGA, peptidoglycan amidase; PGRPs, peptidoglycan-recognizing proteins; RMSD, root-mean-square deviation; Slt, soluble lytic transglycosylase; SPR, surface plasmon resonance; VcNagZ, *Vibrio cholerae* NagZ.

\* Corresponding author.

E-mail address: [xjuan@iqfr.csic.es](mailto:xjuan@iqfr.csic.es) (J.A. Hermoso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.002>  
1368-7646/© 2016 Published by Elsevier Ltd.

### 4.1.1. Discusión

La pared celular es una estructura dinámica que se recicla continuamente, los fragmentos producidos para la biosíntesis durante el reciclaje de la pared son también utilizados como mensajeros para la comunicación bacteriana y son detectados por las células eucariotas como iniciadores de la respuesta inmune.

Mientras que la producción de  $\beta$ -lactamasas en organismos Gram negativos se conoce desde hace años, la relación entre resistencia a antibióticos y reciclaje de la pared ha sido descubierta recientemente (Johnson et al 2013, Fisher and Mobashery 2014). En presencia de antibióticos, los fragmentos de muropéptidos se acumulan en el citoplasma y como resultado se activa el proceso de producción de las AmpC  $\beta$ -lactamasas. La naturaleza de los distintos muropéptidos como señalizadores capaces de inducir la producción de  $\beta$ -lactamasas es muy relevante. En el caso de *P. aeruginosa*, solo dos muropéptidos (NAG-1,6 anhidroNAM pentapéptido y 1,6anhidroNAM pentapéptido) se han identificado como señalizadores (Lee et al 2016).

La expresión de AmpC es una de las principales rutas que la bacterias emplean para combatir la resistencia, sin embargo, se han descubierto nuevas rutas que conectan el reciclaje de la pared con la resistencia a antibióticos. Por ejemplo se ha identificado recientemente una nueva ruta metabólica conectando reciclaje y resistencia intrínseca a la fosfomicina en *Pseudomonas putida* (Gisin et al, 2013).

Visión global de las máquinas macromoleculares del reciclaje de la pared bacteriana.

Diferentes PG hidrolasas están involucradas en crecimiento y morfología de la bacteria. En el caso concreto del proceso del reciclaje, diferentes hidrolasas se pueden encontrar tanto en el citoplasma como en el periplasma de la pared de la bacteria. Las LTs catalizan el corte no hidrolítico de la cadena glicánica entre el NAM y la NAG con

la consecuente formación NAG-AnhNAM. Este corte se puede llevar a cabo por el extremo de la cadena (actividad exolítica) o por el medio de la cadena (actividad endolítica). Las LTs se pueden encontrar de forma soluble en el periplasma (Slts) o ancladas a la membrana interna o externa de la pared bacteriana (Mlts).

En *P. aeruginosa* la inhibición de las LTs afecta directamente a la resistencia a antibióticos produciendo la  $\beta$ -lactamasa AmpC, además recientemente se ha demostrado que Mlts contribuyen a la estabilidad mecánica de la envoltura celular. Estudios experimentales confirman que la supresión de varias Mlts aumenta la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos (Lamers et al., 2015). Las LTs también están involucradas en patogénesis, los productos de reacción de las mismas afectan directamente sobre la infección en células eucariotas.

El producto resultante de las LTs es internalizado en donde se hidroliza por la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa NagZ, que rompe el enlace glicosídico entre los azúcares NAG-AnhNAM, para generar NAG y los productos anhidrosacáridos. Varios estudios confirman que NagZ es esencial para el reciclaje de la pared de la bacteria pero no para el crecimiento celular de la misma (Cheng et al., 2000, Votsch and Templin, 2000).

Las PG amidasas rompen el enlace NAM-L-Ala liberando la parte peptídica. AmpD, que es una PG amidasa periplásmica directamente relacionada con la resistencia a antibióticos, porque está implicada en la producción de la AmpC- $\beta$ -lactamasas. En el caso concreto de *P. aeruginosa* posee dos genes adicionales llamados *ampDh2* y *ampDh3* (Juan et al, 2011). La inactivación de los tres genes parálogos produce una producción elevada de  $\beta$ -lactamasas. A diferencia de AmpD, AmpDh2 y AmpDh3 son amidasas periplásmicas. La redundancia de estas amidasas en el caso de *P. aeruginosa* ha demostrado ser fundamental tanto para la adquisición de resistencia como para la virulencia (Juan et al., 2006).

AmpR es la encargada de regular la expresión de AmpC- $\beta$ -lactamasas. La hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas como AmpC es uno de los mecanismos que utilizan las

bacterias para luchar contra los antibióticos. La capacidad de inducción de AmpC está íntimamente ligada con el reciclaje de la pared del PG (Lindquist et al., 1989).





## 4.2 Introducción a la caracterización de la transglicosilasa lítica SltB3 y aportación de la autora

SltB3 es una transglicosilasa lítica formada por 448 amino ácidos (47.7 kDa), es una enzima multidominio que se encuentra soluble en el periplasma.

Esta enzima pertenece a la Familia 3 según la clasificación por familias de Blackburn and Clarke (Blackburn and Clarke, 2000) y al igual que el resto de enzimas que pertenecen a esta familia, SltB3 contiene un Glu conservado (E145) como residuo catalítico y un motivo E-F de unión a calcio. El motivo de unión a calcio canónico consiste en doce residuos empezando con un Asp y terminando con un Glu. El calcio está coordinado por siete átomos y presenta una geometría molecular de bipirámide pentagonal. Sin embargo, el motivo de unión a calcio que presentan las enzimas de esta familia, tiene 15 residuos y está coordinado por seis átomos con una geometría octaédrica (van Asselt and Dijkstra, 1999). La función del motivo de unión a calcio es desconocida, aunque se cree que podría estar relacionada con la estabilidad de la enzima o con la interacción de estas enzimas con otras proteínas involucradas en el proceso de remodelado de la pared bacteriana, como las PBPs (von Rechenberg et al., 1996).

De la Familia 3 se han resuelto previamente las estructuras de MltB de *E. coli* y de SltB1 de *P. aeruginosa* y ambas presentan un dominio catalítico con un plegamiento similar al de la lisozima de ganso (Thunnissen et al., 1995).

El propósito de este trabajo es resolver la estructura tridimensional de SltB3 en su forma apo, así como la de sus complejos con análogos de la pared bacteriana y junto con experimentos de LC/MS/MS poder identificar la relación estructura-actividad de esta enzima y de las implicaciones para su función biológica *in vivo*.

La autora de esta tesis se ha encargado de la cristalización y resolución estructural de SltB3 en su forma apo y en complejo con los ligandos sintéticos de la pared bacteriana, así como del análisis estructural.

## Turnover of Bacterial Cell Wall by SltB3, a Multidomain Lytic Transglycosylase of *Pseudomonas aeruginosa*

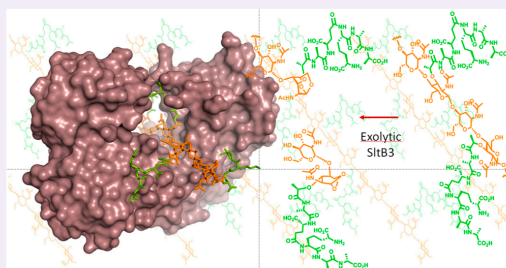
Mijoon Lee,<sup>†,§</sup> Teresa Domínguez-Gil,<sup>‡,§</sup> Dusan Heseck,<sup>†</sup> Kiran V. Mahasenan,<sup>†</sup> Elena Lastochkin,<sup>†</sup> Juan A. Hermoso,<sup>\*,‡</sup> and Shahriar Mobashery<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Nieuwland Science Hall, Notre Dame, Indiana 46556, United States

<sup>‡</sup>Department of Crystallography and Structural Biology, Inst. Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** A family of 11 lytic transglycosylases in *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic human pathogen, turn over the polymeric bacterial cell wall in the course of its recycling, repair, and maturation. The functions of these enzymes are not fully understood. We disclose herein that SltB3 of *P. aeruginosa* is an exolytic lytic transglycosylase. We characterize its reaction and its products by the use of peptidoglycan-based molecules. The enzyme recognizes a minimum of four sugars in its substrate but can process a substrate comprised of a peptidoglycan of 20 sugars. The ultimate product of the reaction is *N*-acetylglucosamine-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramic acid. The X-ray structure of this enzyme is reported for the first time. The enzyme is comprised of four domains, arranged within an annular conformation. The polymeric linear peptidoglycan substrate threads through the opening of the annulus, as it experiences turnover.



The cell wall, a cross-linked polymer that encases the entire bacterium, is critical for survival. The peptidoglycan, the major constituent of the cell wall, is comprised of a linear polymer of repeating *N*-acetylglucosamine (NAG)–*N*-acetylmuramic acid (NAM) disaccharide, with a peptide stem appended to the NAM unit (Figure 1). Cross-linking of the neighboring peptidoglycan strands takes place at the peptide stems. The mature cell wall is a single molecule of significant complexity, which is assembled and recycled in a dynamic manner.<sup>1</sup> Recycling of the cell wall takes place in response to damage (due to antibiotics, for example), to the construction of complex macromolecular assemblies such as the flagellum, or to processing during replication that requires changes to the cell wall.<sup>2,3</sup>

The breakdown of the peptidoglycan for the recycling events is performed by lytic transglycosylases (LTs), enzymes that exist within the periplasmic space of Gram-negative bacteria in either soluble or membrane-bound forms. These enzymes perform important biological functions, which are the subjects of intense study. The importance of their functions is underscored by their multiplicity—*Escherichia coli* has eight<sup>3–5</sup> and *Pseudomonas aeruginosa* has 11<sup>6</sup>—and by redundancies of the reactions that they perform. For example, six of the enzymes of *E. coli* could be ablated without any apparent consequence, but the organism cannot survive the loss of seven.<sup>4</sup> The mechanism of reaction of LT has been studied previously.<sup>3,7,8</sup> These enzymes bind to the peptidoglycan and

degrade it either by removal of a disaccharide from the ends of the linear polymer (the exolytic reaction) or by cleavage of the polymer in the middle (the endolytic reaction). Whereas the catalytic sites of LTs bear resemblance to the lysozyme structure, these enzymes are not hydrolytic. The peptidoglycan binds the active site by straddling the seat of the reaction, which is located between the so-called  $-1$  and  $+1$  subsites. The sugars in the peptidoglycan line up in both directions in what are referred to as the  $-i$  to  $+j$  subsites, the number of which could vary from enzyme to enzyme. The active-site glutamate (or aspartate) of LTs would protonate the oxygen of the scissile glycosidic bond, resulting in transient formation of an oxocarbenium species (2). This species entraps the C6-hydroxyl of the NAM unit, resulting in the 1,6-anhydromuramyl product (3). We describe here the properties of SltB3 (also referred to as SltH; the gene for which is annotated as PA3992), a soluble LT of *P. aeruginosa*. Our analysis of the reaction of this enzyme reveals it to be an exolytic enzyme. We also disclose three high-resolution X-ray structures for this enzyme in the apo form and in complexes with the product (3) of the reaction and with a synthetic peptidoglycan-based substrate mimetic (4). These structures reveal for the first time recognition of the peptidoglycan within the opening of the

Received: February 29, 2016

Accepted: April 1, 2016

Published: April 1, 2016

# Turnover of Bacterial Cell Wall by SltB3, a Multidomain Lytic Transglycosylase of *Pseudomonas aeruginosa*

Mijoon Lee,<sup>#</sup> Teresa Domínguez-Gil,<sup>§</sup> Dusan Heseck,<sup>#</sup> Kiran V. Mahasenan,<sup>#</sup> Elena Lastochkin,<sup>#</sup> Juan A. Hermoso,<sup>\*§</sup> and Shahriar Mobashery<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Nieuwland Science Hall, Notre Dame, Indiana 46556, United States, <sup>§</sup>Department of Crystallography and Structural Biology, Inst. Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

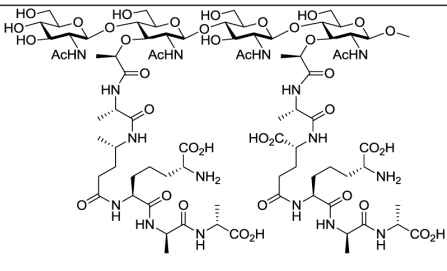
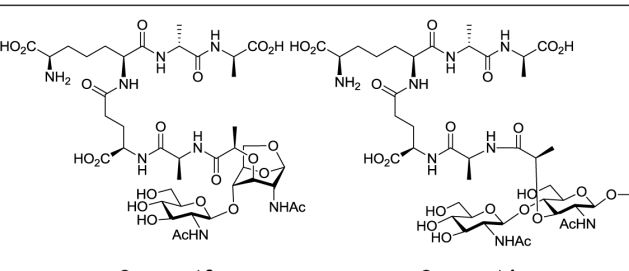
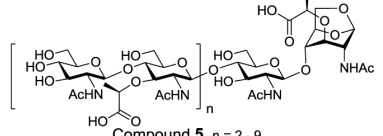
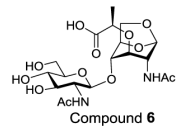
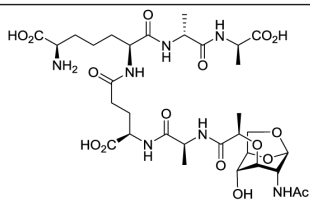
## Supporting Information

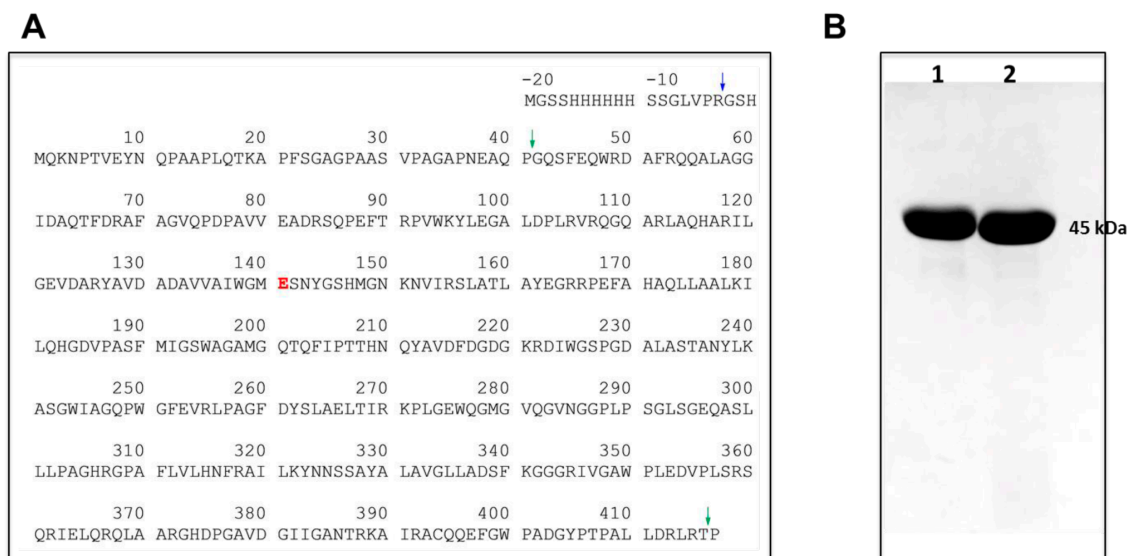
### Contents

Table S1. Compounds used in this study .....	S2
Figure S1. The protein sequence and SDS-PAGE analysis .....	
of the purified recombinant SltB3 .....	S3
Figure S2. CID mass spectra of reaction products <b>1</b> and <b>2</b> .....	S4
Figure S3. Michaelis-Menten plot for turnover of <b>1</b> by SltB3. ....	S3
Table S2. Crystallographic data collection and refinement statistics .....	S5
Figure S4. Structural homologues of SltB3 .....	S6
Figure S5. Electron density maps for compounds <b>3</b> and <b>4</b> .....	S7
Figure S6. Structural analysis of the interactions found at the core of .....	
the N-terminal domain. ....	S8
Figure S7. Structural comparison of active sites of SltB3 and Slt35 .....	
from <i>E. coli</i> .....	S8
References .....	S9

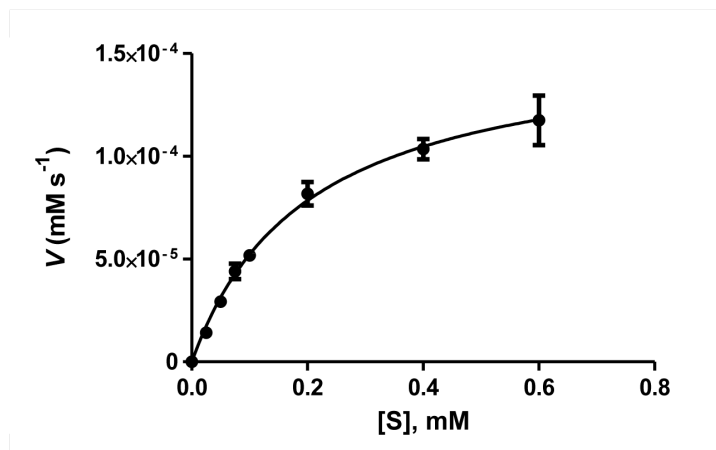
**Compounds used in this study.** Compounds used in this study are given in Table S1. Compounds **1**, **3**, and **4** were prepared according to the synthetic methods that we have published earlier.<sup>1</sup> Compound **5** is a mixture of oligosaccharides with 6-20 sugar moieties, prepared as reported previously.<sup>2</sup> Compound **9** was the internal standard for kinetic evaluation of turnover of compound **1** to compounds **3** and **4** by SltB3.

**Table S1.** Compounds used in this study.

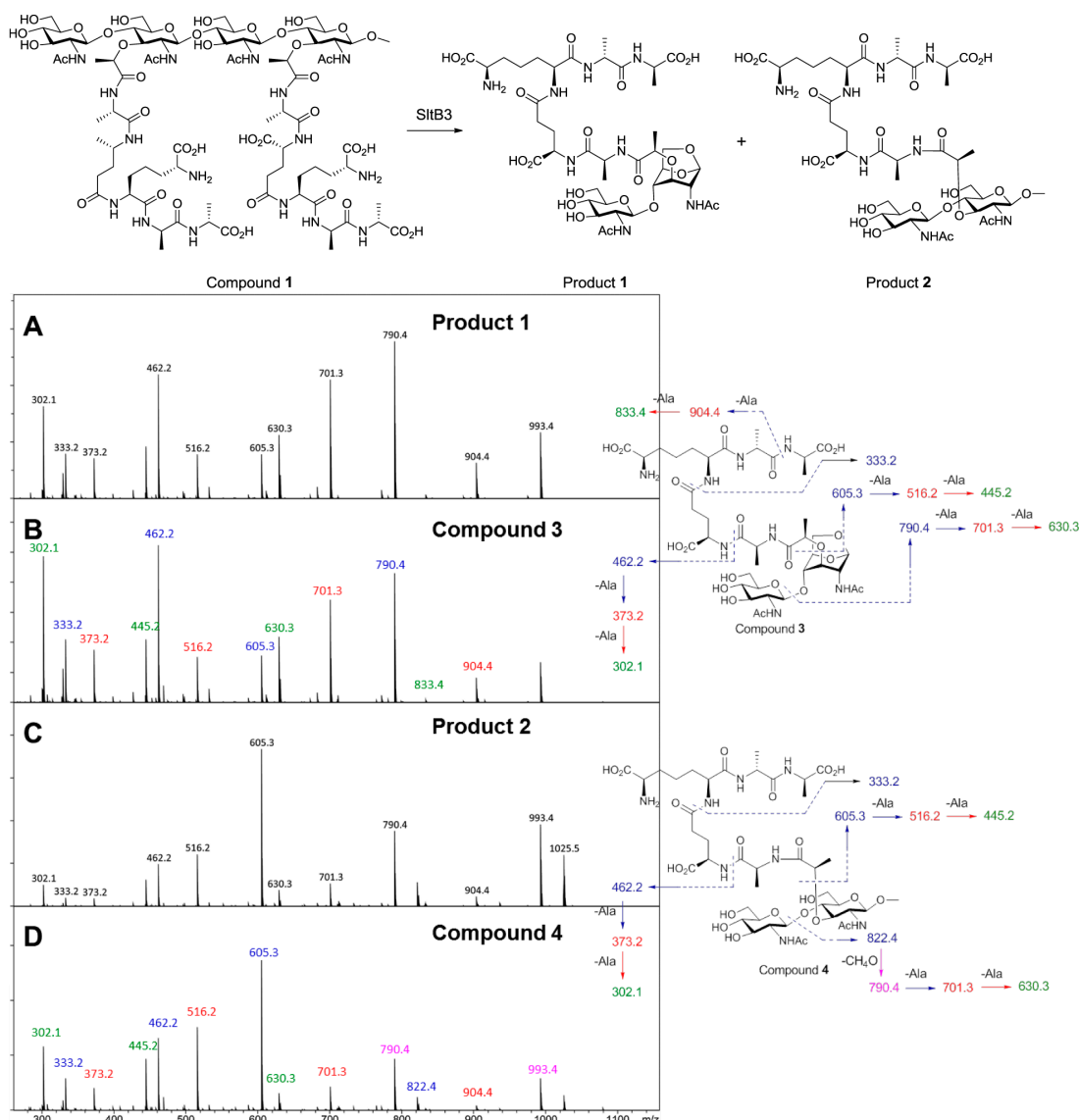
Substrate	Product
 <p>Compound <b>1</b></p>	 <p>Compound <b>3</b>                      Compound <b>4</b></p>
 <p>Compound <b>5</b>, n = 2 - 9</p>	 <p>Compound <b>6</b></p>
Internal standard	
 <p>Compound <b>9</b></p>	



**Figure S1.** (A) The protein sequence of the recombinant SltB3 used in this study. The thrombin cleavage site is indicated by the blue arrow. The green arrows indicate the beginning and the end of the protein sequence as seen by the X-ray structure. The catalytic Glu141 is given in red. (B) SDS-PAGE analysis of the purified recombinant SltB3 (10  $\mu$ g) with His-tag (lane 1) and without His-tag (lane 2).



**Figure S3.** Michaelis-Menten plot for turnover of **1** by SltB3 ( $[E] = 8$  nM).



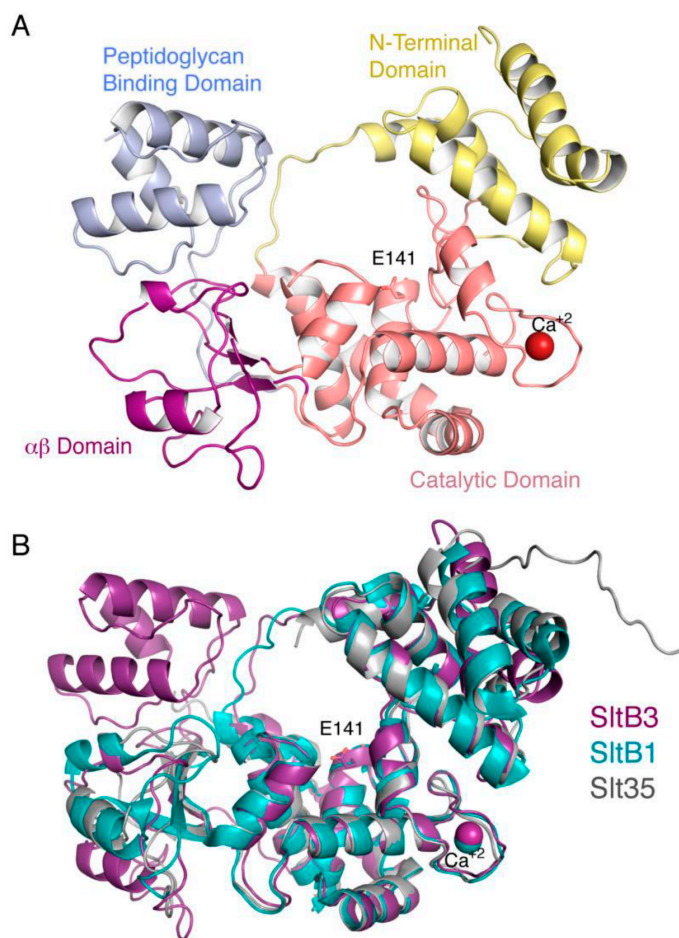
**Figure S2.** CID mass spectra of product **1** (A), of synthetic standard **3** (B), of product **2** (C), and of synthetic standard **4** (D). Fragmentations of the reaction products **1** and **2** were similar to those of respective synthetic standards (compound **3** for product **1**, compound **4** for product **2**). Peaks at  $m/z$  values in blue, 790.4, 605.3, 462.2 and 333.2 represent the ions formed by the concomitant loss of dehydro NAG, dehydroanhydroNAG, lactate and L-Ala, and  $m$ -DAP from precursor ion at  $m/z$  993.4 (A and B). Peaks at  $m/z$  values in red, 904.4, 701.3, 516.2 and 373.2 represent the ions formed by the concomitant loss of terminal D-Ala (89 Da). Peaks at  $m/z$  values in green, 833.4, 630.3, 445.2 and 302.1 represent the ions formed by the concomitant loss of the second D-Ala (71 Da). The peak at  $m/z$  933.4 in C and D represents the ion formed by neutral loss of  $\text{CH}_4\text{O}$  from precursor ion at  $m/z$  1025.5 (and this is chemically identical to compound **3**). Hence, the rest of peaks of fragment ions of product **2** (compound **4**) are similar to product **1** (compound **3**), except the peak at  $m/z$  822.4, formed by concomitant loss of NAG from the precursor ion at  $m/z$  1025.5.

**Table S2. Crystallographic data collection and refinement statistics\***

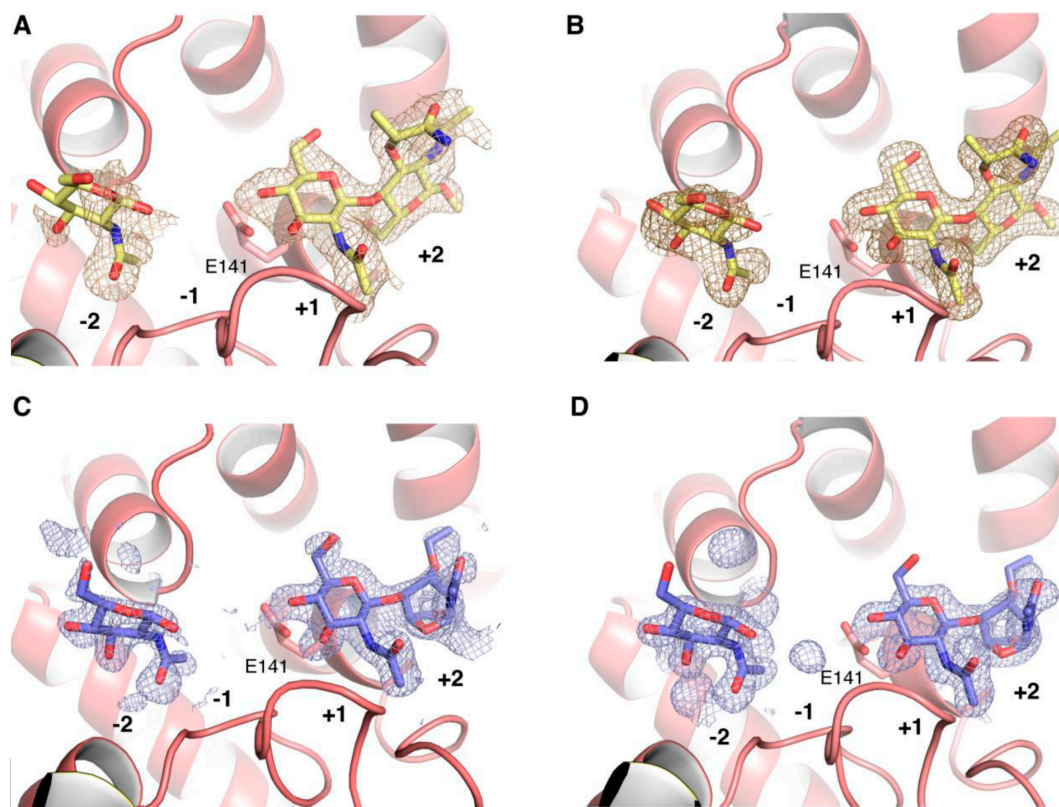
	ApoSltB3	SltB3:3 complex	SltB3:4 complex
Diffraction data statistics			
Wavelength (Å)	1.00001	1.05739	0.97626
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.28, 61.84, 50.63	111.30, 61.53, 49.94	111.10, 61.44, 49.87
$\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90	90	90
Resolution range (Å)	56.14 (1.70- 1.61)	55.65 (1.81-1.77)	61.44 (2.30-2.23)
Unique reflections	46193 (6670)	34168 (1919)	17322 (1581)
Completeness (%)	99.9 (100.0)	99.8 (99.6)	99.9 (99.8)
Redundancy	6.8 (9.1)	12.6 (12.9)	8.5 (8.7)
CC1/2	1.00 (0.93)	1.00 (0.93)	1.00 (0.98)
R <sub>merge</sub>	0.03 (0.70)	0.09 (0.77)	0.06 (0.36)
R <sub>pim</sub>	0.01 (0.24)	0.04 (0.31)	0.02 (0.13)
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	22.1	17.8	29.1
Average I/σ(I)	48.6 (2.7)	20.8 (4.2)	12.3 (4.2)
Refinement statistics			
Resolution range (Å)	54.17-1.61	30.76-1.77	45.56-2.23
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0.18/0.20	0.17/0.20	0.18/0.23
No. Atoms	3133	3242	3044
Protein	2900	2881	2876
Water	233	272	68
Ligand	-	89	100
B-factor (Å <sup>2</sup> )			
Protein	37.10	27.90	49.10
Water	43.40	38.10	46.80
Ligand	-	49.5	69.5
R.m.s. deviations			
Bond length (Å)	0.006	0.006	0.007
Bond angles (°)	0.99	1.05	1.09
Ramachandran	99/0.0	97/0.2	94/1.8
Favored/outliers (%)			
Monomers per AU	1	1	1
PDB code	5ANZ	5AO7	5AO8

\*Values between parentheses correspond to the highest resolution shells

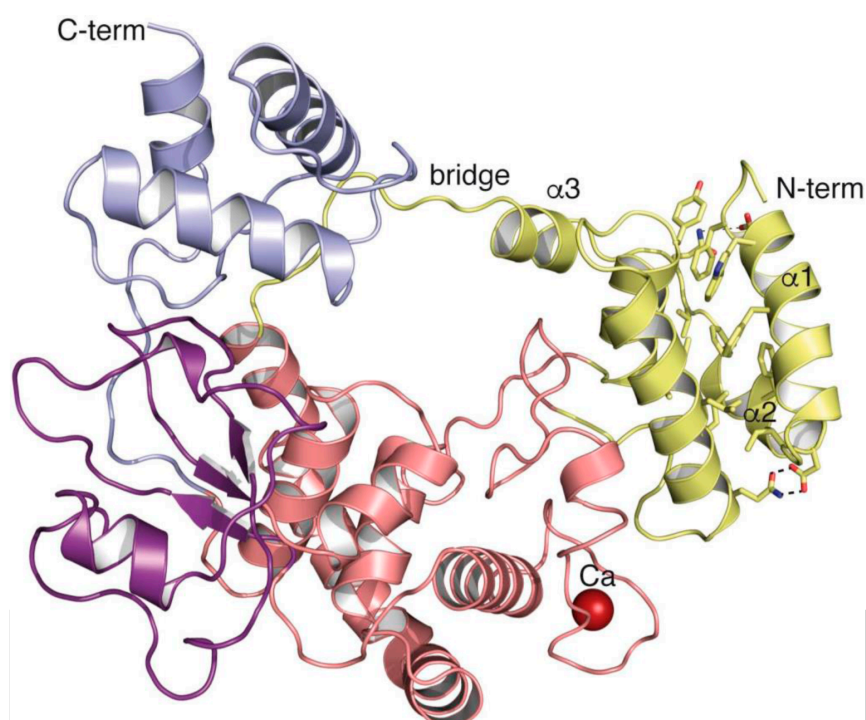




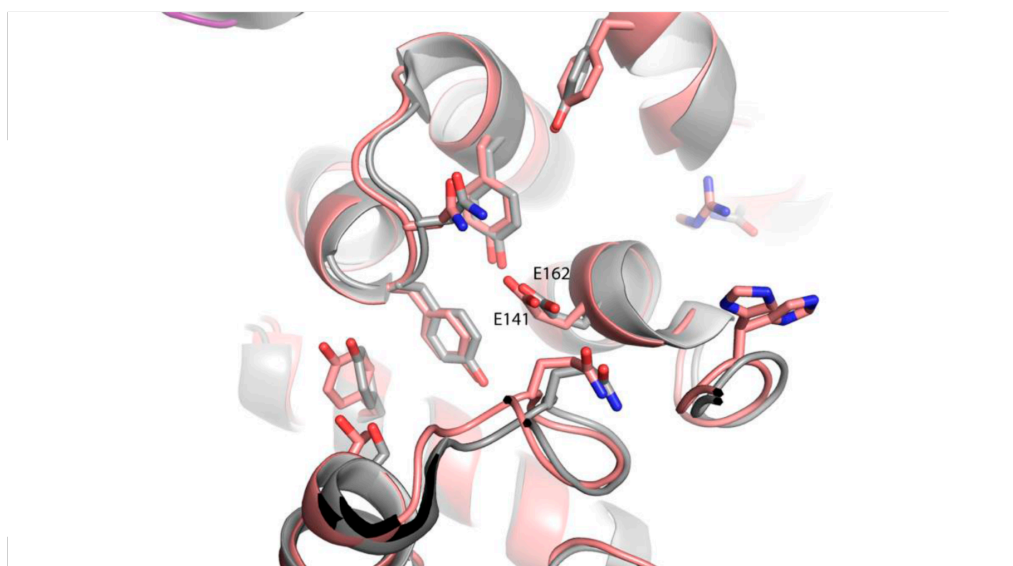
**Figure S4.** (A) Ribbon representation of the crystal structure of apo SltB3. Each domain is colored differently. N-Terminal domain in yellow, catalytic domain in pink,  $\alpha\beta$  domain in magenta and peptidoglycan-binding domain in light blue. The proposed catalytic Glu141 is represented as capped sticks and labeled. Ca cation is represented in spheres (B) Structural comparison of SltB3 with its closest homologues. The closest structural homologues as provided by DALI server<sup>3</sup> are the soluble lytic transglycosylases SltB1 from *P. aeruginosa* (PDB 4ANR, rmsd of 1.89 Å over 375 aligned C $\alpha$  atoms) and Slt35 from *E. coli* (PDB 1QUS, rmsd of 2.18 Å over 375 aligned C $\alpha$  atoms).



**Figure S5.** (A) Fo-Fc omit map contoured at  $2\sigma$  for the two molecules of compound **4** ( $\beta$ -methoxy *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramyl L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) attached to the active site in the SltB3:4 complex. Final refined ligand is superimposed onto omit map for comparison purposes and is represented as capped sticks colored in yellow for carbon atoms. The proposed catalytic Glu141 is represented as capped sticks and colored in pink for carbon atoms. (B) Refined electron-density map (2Fo-Fc map contoured at  $1\sigma$ ) for the two molecules of compound **4** attached to the active site of the SltB3:4 complex. Ligand is represented as in panel A. (C) Fo-Fc omit map contoured at  $2\sigma$  for the two molecules of compound **3** (*N*-acetylglucosamine-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramyl L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) observed in the SltB3:3 complex. Final refined modeled ligand is superimposed onto omit map for comparison purposes and is represented as capped sticks colored in blue for carbon atoms. The proposed catalytic Glu141 is represented as capped sticks and colored in pink for carbon atoms. (D) Refined electron-density map (2Fo-Fc map contoured at  $1\sigma$ ) for the two molecules of compound **3** observed in the SltB3:3 complex. Ligands are represented as in panel C. No electron density was observed for the peptide stems or for the sugar ring at position -1 for the two complexes.



**Figure S6.** Structural analysis of the interactions found at the core of the N-terminal domain. Many hydrophobic residues and some polar residues (all depicted as capped sticks) comprise the core of the N-terminal domain linking the first three helices with the other two within the domain.



**Figure S7.** Structural comparison of active sites of SltB3 (pink) and Slt35 from *E. coli* (PDB 1QUS) (grey). Catalytic glutamate residues in both structures are labeled.

## References

- (1) Heseck, D., Lee, M., Zhang, W. L., Noll, B. C., and Mobashery, S. (2009) Total synthesis of *N*-acetylglucosamine-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramylpentapeptide and evaluation of its turnover by AmpD from *Citrobacter freundii*. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 5187-5193; Lee, M., Heseck, D., Shah, I. M., Oliver, A. G., Dworkin, J., and Mobashery, S. (2010) Synthetic peptidoglycan motifs for germination of bacterial spores. *ChemBioChem* *11*, 2525-2529; Lee, M. J., Zhang, W. L., Heseck, D., Noll, B. C., Boggess, B., and Mobashery, S. (2009) Bacterial AmpD at the crossroads of peptidoglycan recycling and manifestation of antibiotic resistance. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 8742-8743.
- (2) Artola-Recolons, C., Lee, M., Bemardo-Garcia, N., Blazquez, B., Heseck, D., Bartual, S. G., Mahasenan, K. V., Lastochkin, E., Pi, H. L., Boggess, B., Meindl, K., Uson, I., Fisher, J. F., Mobashery, S., and Hermoso, J. A. (2014) Structure and cell wall cleavage by modular lytic transglycosylase MltC of *Escherichia coli*. *ACS Chem. Biol.* *9*, 2058-2066.
- (3) Holm, L., and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* *38*, W545-W549.

## 4.2.1. Discusión

La estructura tridimensional de la SltB3 se resolvió por la técnica de reemplazo molecular a una resolución de 1.61 Å.

La estructura de SltB3 presenta cuatro dominios bien definidos: el dominio N-terminal, el dominio catalítico, el dominio  $\alpha\beta$  y el dominio de unión a PG. La estructura de SltB3 tiene una conformación anular única no presente en ninguna LT resuelta hasta el momento.

Análisis por espectrometría de masas de los productos de reacción de SltB3 con el sáculo (parel aislada de la bacteria) confirmaron que SltB3 es una enzima mayoritariamente exolítica. Estos estudios de LC/MS/MS combinados con el análisis estructural de los complejos del análogo de sustrato ( $\beta$ -metoxi *N*-acetilglucosamina-*N*-acetylmuramil L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) y del producto (1,6-anhidro-*N*-acetylmuramil- *N*-acetilglucosamina L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) han permitido proponer un mecanismo de reacción procesivo para esta enzima

Las estructuras en complejo con el sustrato y con el producto presentan densidad electrónica en las posiciones -2, +1 y +2. En la posición -1 no se observa densidad electrónica para el azúcar. En ninguno de los casos se observa densidad electrónica para la parte peptídica.

De la estructura en complejo con el análogo de sustrato se identificaron varios aminoácidos responsables de la estabilización del mismo. El glutámico catalítico (E145) y el grupo amida del Asn328 establecen una fuerte interacción con el oxígeno glicosídico en la posición +1.

Analizando la cavidad de unión al sustrato de las estructuras presentadas en este trabajo podemos decir que esta se adapta en función de si tiene el producto o el sustrato unido. La cavidad de SltB3 se estrecha en presencia del sustrato para poder así

acomodarlo y que la reacción tenga lugar, y se ensancha una vez la reacción ha ocurrido y el producto se ha formado.

A partir de la estructura resuelta por cristalografía de rayos X de SltB3 y la estructura tridimensional resuelta por RMN del peptidoglicano (Meroueh et al., 2006), se ha propuesto un modelo de como SltB3 interaccionaría con el PG de modo que la cadena intacta del PG queda estabilizada en la cavidad anular durante su reacción *in vivo*.

## 4.3 Introducción a la caracterización de la transglicosilasa lítica MltF y aportación de la autora.

MltF (490aa, 55.22 kDa) es una enzima modular que se encuentra anclada a la membrana de la pared bacteriana, pertenece a la Familia 1 de las LTs. Al igual que en el resto de familias (exceptuando la 2) el plegamiento del dominio catalítico guarda similitud con el de la lisozima de ganso (Blackburn and Clarke, 2001). La MltF pertenece a la subfamilia B que se caracteriza por tener una estructura modular única que presenta dos dominios: un dominio catalítico C-terminal y un dominio N-terminal de función desconocida con homología de secuencia con la proteínas de unión a sustrato (SBPs) (del inglés *substrate binding protein*) presentes en algunos transportadores ABC (del inglés *ATP-binding cassette*). Este dominio de función desconocida según estudios realizados por Clarke y Scheurwater parece modular la actividad del dominio catalítico (Scheurwater and Clarke, 2008).

El propósito de este trabajo es la caracterización estructural y funcional de MltF y de los complejos con análogos de la pared bacteriana. Se pretende la identificación del mecanismo de acción y regulación del dominio de función desconocida, el análisis de estructura-actividad de MltF y de las implicaciones de su función biológica *in vivo*.

La autora de esta tesis se ha encargado de la cristalización y resolución estructural en su forma apo y en complejo con los ligandos sintéticos de la pared bacteriana, así como del análisis estructural.

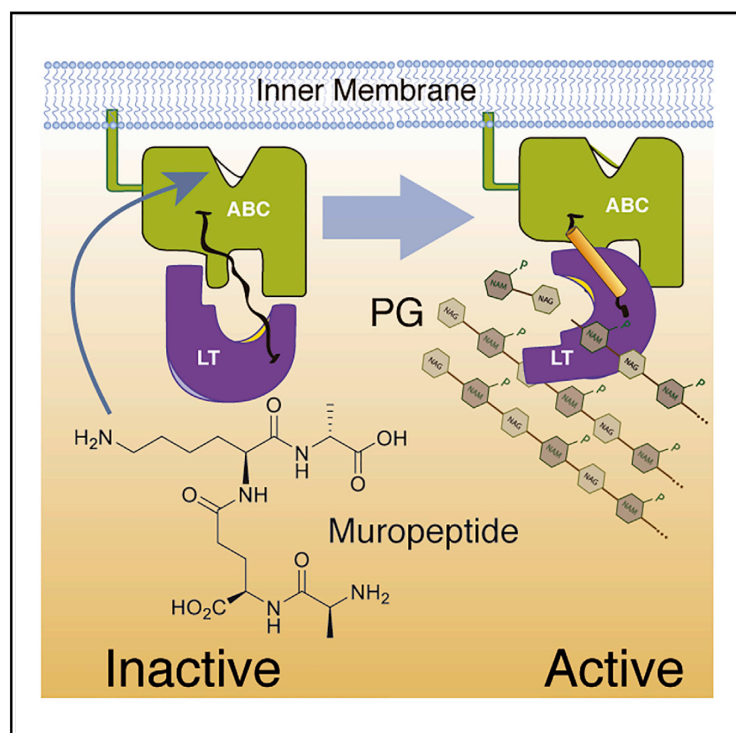




# Structure

## Activation by Allostery in Cell-Wall Remodeling by a Modular Membrane-Bound Lytic Transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa*

### Graphical Abstract



### Authors

Teresa Domínguez-Gil, Mijoon Lee, Iván Acebrón-Avalos, ..., Jed F. Fisher, Shahriar Mobashery, Juan A. Hermoso

### Correspondence

mobashery@nd.edu (S.M.),  
xjuan@iqfr.csic.es (J.A.H.)

### In Brief

How enzymes that interact with the bacterial cell wall are regulated is largely unknown. Domínguez-Gil et al. show that the activity of the lytic transglycosylase MltF of *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by an allosteric mechanism involving interaction with a peptidoglycan-derived effector.

### Highlights

- Modular LT having a catalytic module and an ABC-transporter-like regulatory module
- Both regulatory module and the linker region keep MltF in an inactive conformation
- Muropeptide binding at regulatory module triggers MltF activation
- First case of allosteric regulation in an LT spurred by dramatic structural changes

### Accession Numbers

5A5X  
5AA1  
5AA2  
5AA4  
5AA3

Domínguez-Gil et al., 2016, Structure 24, 1–13  
October 4, 2016 © 2016 Published by Elsevier Ltd.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.07.019>

CellPress

Please cite this article in press as: Domínguez-Gil et al., Activation by Allostery in Cell-Wall Remodeling by a Modular Membrane-Bound Lytic Transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa*, Structure (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.07.019>

## Structure Article

CellPress

# Activation by Allostery in Cell-Wall Remodeling by a Modular Membrane-Bound Lytic Transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa*

Teresa Domínguez-Gil,<sup>1,4</sup> Mijoon Lee,<sup>2,4</sup> Iván Acebrón-Avalos,<sup>1</sup> Kiran V. Mahasenan,<sup>2</sup> Dusan Heseck,<sup>2</sup> David A. Dik,<sup>2</sup> Byungjin Byun,<sup>2</sup> Elena Lastochkin,<sup>2</sup> Jed F. Fisher,<sup>2</sup> Shahriar Mobashery,<sup>2,\*</sup> and Juan A. Hermoso<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, IN 46556, USA

<sup>3</sup>Lead Contact

<sup>4</sup>Co-first author

\*Correspondence: [mobashery@nd.edu](mailto:mobashery@nd.edu) (S.M.), [xjuan@iqfr.csic.es](mailto:xjuan@iqfr.csic.es) (J.A.H.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.07.019>

## SUMMARY

Bacteria grow and divide without loss of cellular integrity. This accomplishment is notable, as a key component of their cell envelope is a surrounding glycopeptide polymer. In Gram-negative bacteria this polymer—the peptidoglycan—grows by the difference between concurrent synthesis and degradation. The regulation of the enzymatic ensemble for these activities is poorly understood. We report herein the structural basis for the control of one such enzyme, the lytic transglycosylase MltF of *Pseudomonas aeruginosa*. Its structure comprises two modules: an ABC-transporter-like regulatory module and a catalytic module. Occupancy of the regulatory module by peptidoglycan-derived muropeptides effects a dramatic and long-distance (40 Å) conformational change, occurring over the entire protein structure, to open its active site for catalysis. This discovery of the molecular basis for the allosteric control of MltF catalysis is foundational to further study of MltF within the complex enzymatic orchestration of the dynamic peptidoglycan.

## INTRODUCTION

The assembly of the bacterial cell wall is among the least understood biological events. Although we have a credible understanding of the molecular and macromolecular components of the cell wall—the lipids, the structural proteins, the enzyme catalysts, and the peptidoglycan polymer—we do not understand how these components individually integrate into a dynamic structural edifice that allows a bacterium to replicate itself within minutes, while preserving structural integrity throughout. In this particular respect, the peptidoglycan component of the cell wall of the bacterium presents a structural dilemma. The peptidoglycan is a polymer that surrounds the bacterium, and yet it expands and divides as a polymer in coordination (and in the face of considerable internal pressure) with both the cytoplasmic and

membrane events of bacterial reproduction (Rojas et al., 2014; Tuson et al., 2012). While the chemical bonding of the oligomeric peptidoglycan is known—glycan strands consisting of a repeating  $\beta$ -1,4-linked *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramic acid (NAG-NAM) disaccharide, cross-linked to adjacent glycan strand(s) through the peptide stem emanating from the *N*-acetylmuramic acid saccharide—the three-dimensional arrangement of these oligomers and the enzymatic events of its growth and division are not known (Lovering et al., 2012; Turner et al., 2014). Notwithstanding its identity as a polymer, the peptidoglycan is a dynamic structure. Indeed, this structure is in constant turnover by processes that involve a large number of enzymes (Johnson et al., 2013). The enzymatic activities that fabricate the peptidoglycan structure in Gram-negative bacteria correspond to activities that build the polymer (notably transglycosylases and transpeptidases) and activities that cleave (or remodel) the polymer (notably amidases and lytic transglycosylases). Each of these activities corresponds to a family of enzymes, having seemingly extensive functional redundancy within each family. Accordingly, experimental design to clarify the catalytic activity of any one member of these families is challenging.

Of the four primary enzymatic families that act on the peptidoglycan, arguably that of lytic transglycosylases (LTs) is the most enigmatic (Scheurwater et al., 2008). The reaction catalyzed by these enzymes is the non-hydrolytic cleavage of the glycan strand of the peptidoglycan, with formation of the non-reducing *N*-acetyl 1,6-anhydromuramic and the *N*-acetylglucosamine as the two termini (Figure 1). The inability to create a viable phenotype upon attempted genetic deletion of the LT family of *Escherichia coli* implicates aspects of their collective activities as essential (Scheurwater and Clarke, 2008). The importance of the LT family is further demonstrated by the substantially decreased viability and antibiotic resistance observed as a result of the genetic deletion of selective members of this family in both *E. coli* (Heidrich et al., 2002) and *Pseudomonas aeruginosa* (Cavallari et al., 2013; Lamers et al., 2015). Indeed, LT activity in Gram-negative bacteria contributes directly to peptidoglycan growth, to peptidoglycan cleavage in septation (Cloud and Dillard, 2004; Jorgenson et al., 2014; Yahashiri et al., 2015), to the structural integrity of the cell wall (Lamers et al., 2015), to the expression of virulence as a result of the release of

Structure, Volume 24

## Supplemental Information

### **Activation by Allostery in Cell-Wall Remodeling by a Modular Membrane-Bound Lytic Transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa***

**Teresa Domínguez-Gil, Mijoon Lee, Iván Acebrón-Avalos, Kiran V. Mahasenan, Dusan Hesek, David A. Dik, Byungjin Byun, Elena Lastochkin, Jed F. Fisher, Shahriar Mobashery, and Juan A. Hermoso**

## Supporting Information

### 1. Supplemental Figures

- **Figure S1 related to Figure 3.** Structural comparison of the regulatory module of MltF with its closest homologues.
- **Figure S2 related to Figure 2.** Structural comparison of catalytic module of MltF with its closest homologues.
- **Figure S3 related to Figure 3.** The apo RM of MltF resembles the liganded conformation of ABC transporters.
- **Figure S4 related to Figure 3.** Binding of mucopeptide **3**, **2** and **1** to regulatory module in MltF.
- **Figure S5 related to Figure 4.** Allosteric signal transmission from the ABC. transporter module to the Catalytic Module upon mucopeptide binding.
- **Figure S6 related to Figure 6.** Structural comparison between structures of the inactive conformation MltF and the fully open conformation for the same enzyme.
- **Figure S7 related to Figure 2.** Multiple sequence alignment of the conserved RM-linker-CM domains of *P. aeruginosa* MltF (PA3764), *P. aeruginosa* MltF2 (PA2865), and *E. coli* MltF (ECK2556).

### 2. Supplemental Movies

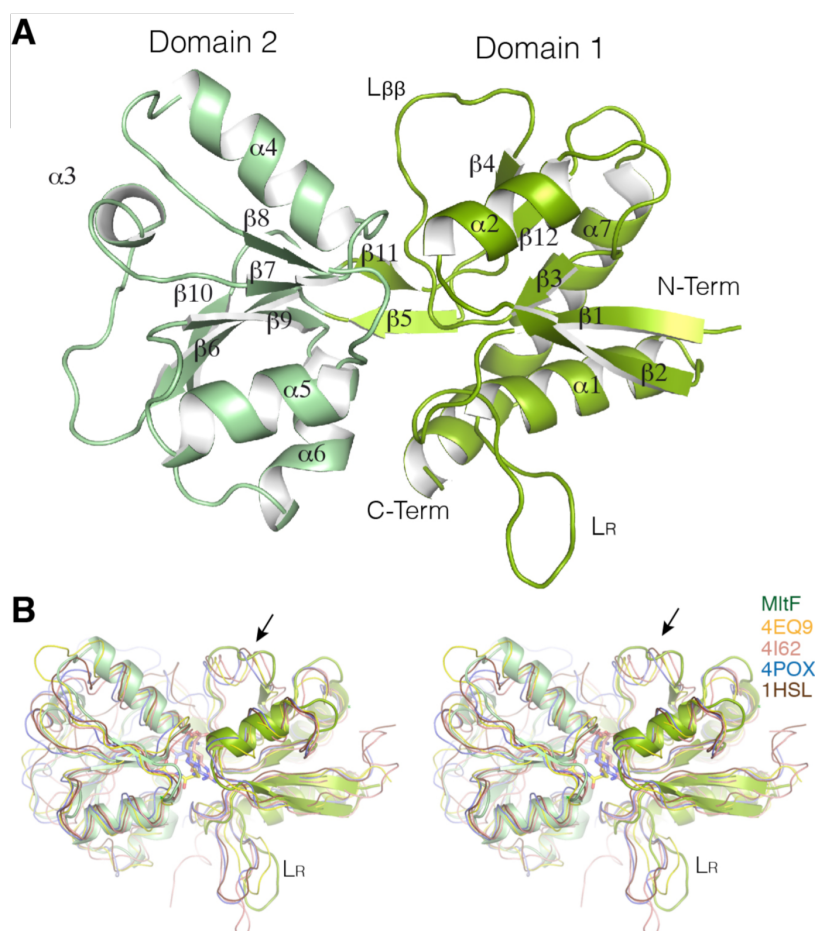
- **Movie S1 related to Figure 4.** Structural changes in MltF upon mucopeptide **3** binding at the RM.
- **Movie S2 related to Figure 6.** Targeted-molecular dynamics simulation between the closed conformations of MltF (this work) and the fully open crystal structure (PDB ID: 4P11). Modules are colored as in Figure 2.

### 3. Supplemental Experimental Procedures

- **3.1 Sequence Alignments.**

#### **4. Supplemental References**

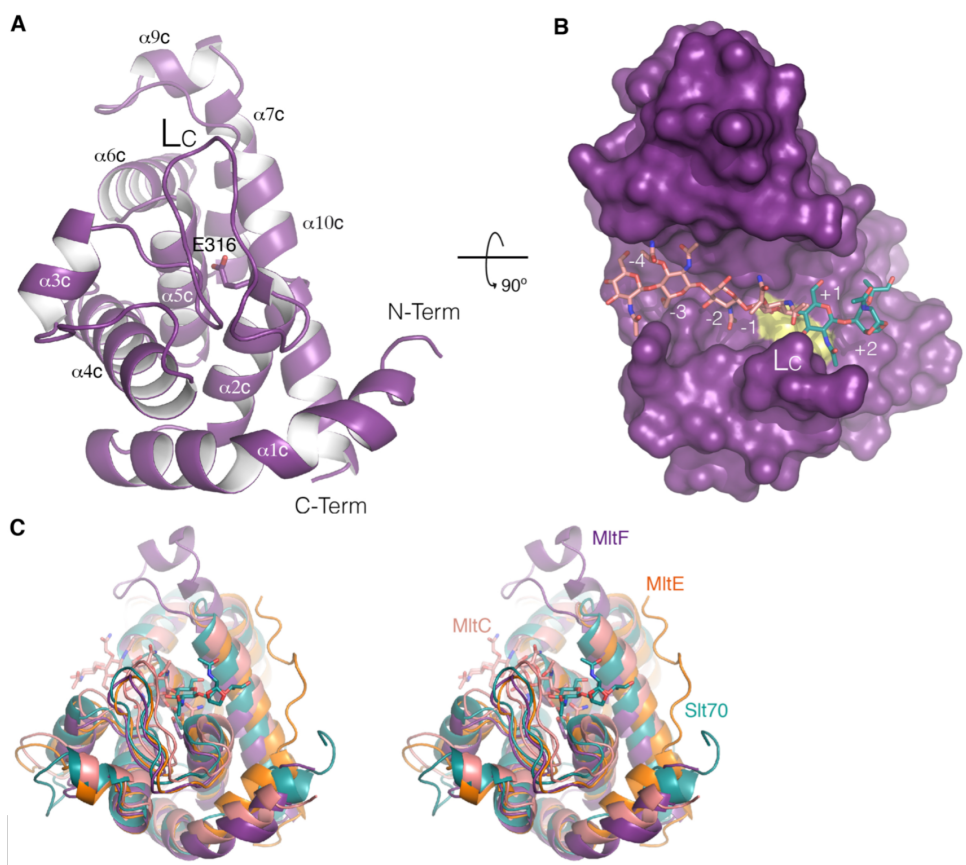
## 1- Supplemental Figures



**Figure S1 related to Figure 3. Structural comparison of the regulatory module of MltF with its closest homologues.**

(A) The three-dimensional structure of the RM of MltF, with main components labelled. (B) Stereo view showing the structural superimposition of RM of MltF with its closest homologues (labeled). All belong to the ABC transporters from the F-IV group of amino-acid-binding proteins. The ABC transporter glutathione-binding protein from *Streptococcus pneumoniae* in complex with glutathione (PDB code 4EQ9) is the most closely related structure to the RM. Despite the low sequence identity (17%) this structure shows an rmsd of 2.1 Å over 219 aligned Cα atoms. Other close homologues are the nopaline-binding periplasmic protein NocT from *Agrobacterium fabrum* in complex with nopaline (PDB code 4POX, rmsd of 2.1 Å over 216 aligned Cα atoms), the amino acid ABC transporter substrate-binding protein AbpA from *S. pneumoniae* bound to L-Arg (PDB code 4I62, rmsd of 2.1 Å over 216 aligned Cα atoms). The Histidine-binding protein from *E. coli* in complex with His (PDB code 1HSL, rmsd of 3.2 Å

over 155 aligned C $\alpha$  atoms). The F-IV group usually presents an  $\alpha$ -helix with an arginine residue, which forms a salt bridge with carboxyl group of the amino-acid substrate. Neither the  $\alpha$ -helix nor the arginine is conserved in the RM of MltF. In MltF this  $\alpha$ -helix is replaced by the flexible loop L $\beta\beta$  (indicated by an arrow at 1 o'clock) placed at the entrance of the allosteric site.

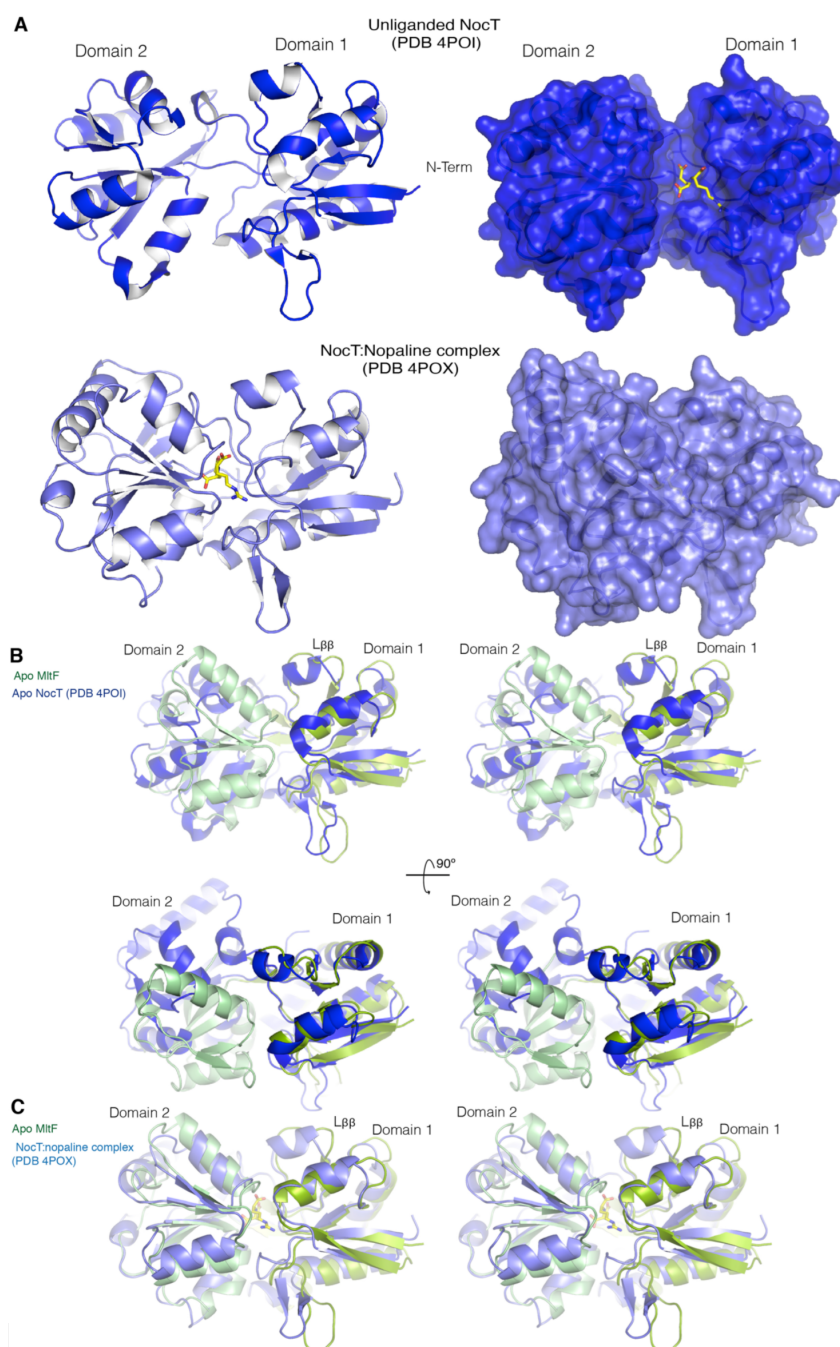


**Figure S2 related to Figure 2. Structural comparison of catalytic module of MltF with its closest homologues.**

(A) The three-dimensional structure of CM of MltF with main components labeled. The side chain of the catalytic Glu316 is depicted in capped sticks. The CM is located at the C-terminal position and is comprised of 10  $\alpha$ -helices. The CM presents a typical fold of goose-type of lysozymes, as also seen in other lytic transglycosylases, with the catalytic Glu316 residue located at the end of the  $\alpha$ 2c helix. (B) Molecular surface of the catalytic module of MltF is shown with the position of the catalytic Glu residue in yellow. Tetrasaccharide (pink for carbons) and NAG-anhNAM (blue for carbons) are depicted within the active site as obtained by direct superimposition of the MltF catalytic module with the MltC:tetrasaccharide complex (PDB 4CFO) and Slt70:NAG-anhNAM complex (PDB 1QTE) respectively. The catalytic cavity can accommodate at least six saccharide rings (occupying positions -4 to +2). (C) Stereo view showing the structural superimposition of CM of MltF with its closest homologues (labeled). The closest structural homologues as provided by DALI server (Holm et al, 2014) are the catalytic module of the membrane-



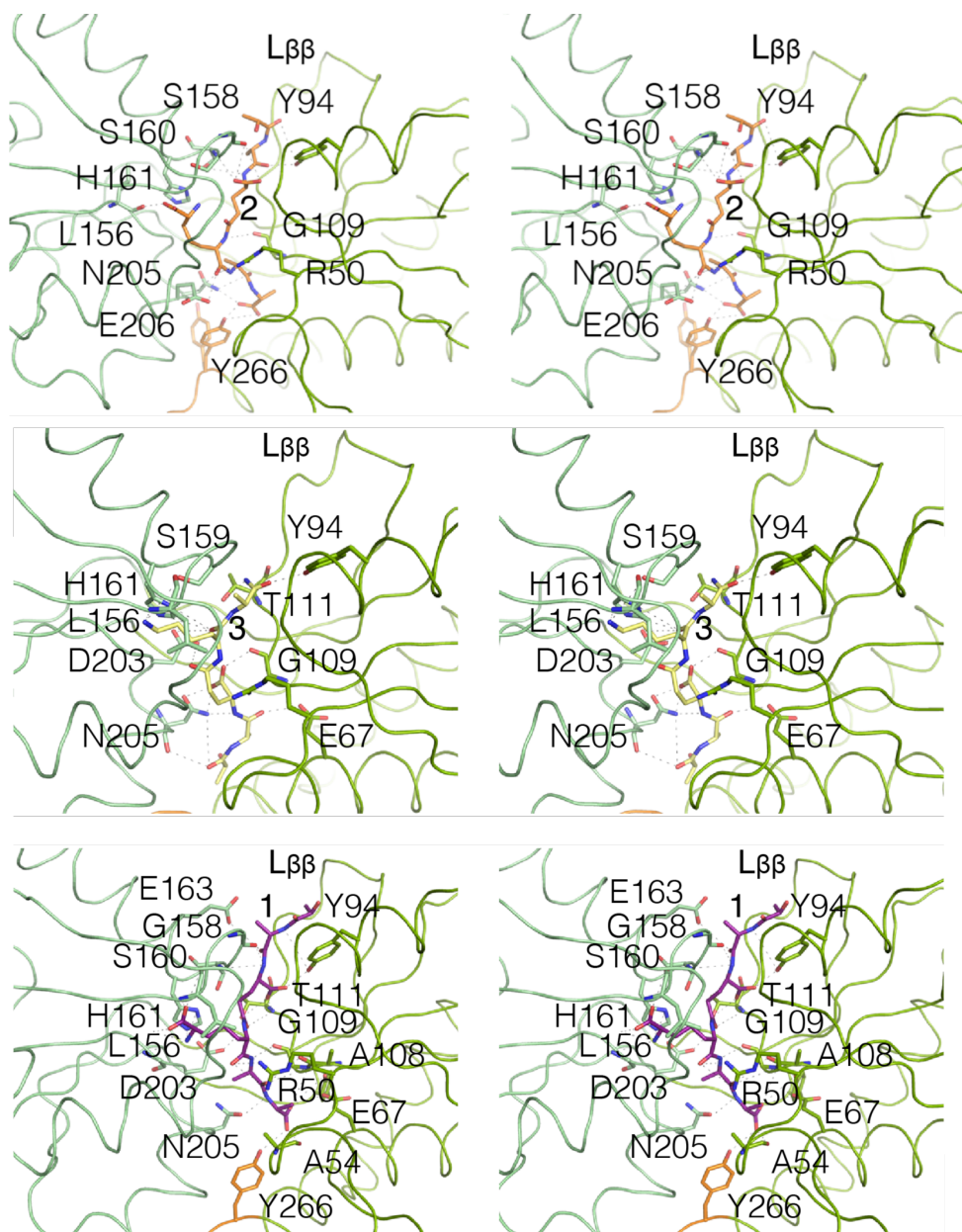
bound lytic transglycosylase MltC from *E. coli* (PDB 4CFO, rmsd of 2.7 Å over 156 aligned Cα atoms), the endolytic LT MltE from *E. coli* (PDB 4Y8P, rmsd of 2.3 Å over 157 aligned Cα atoms) and the catalytic module of the soluble LT Slt70 from *E. coli* (PDB 1QTE, rmsd of 2.1 Å over 149 aligned Cα atoms). Substrate analogues as found in MltC and Slt70 complexes (PDB 4CFO and 1QTE respectively) are depicted as capped sticks.



**Figure S3 related to Figure 3. The apo RM of MltF resembles the liganded conformation of ABC transporters.**

(A) The nopaline-binding periplasmic protein NocT from *Agrobacterium fabrum* follows the “Venus Fly-Trap” Mechanism. In the absence of ligand (Heidrich et al.), NocT presents an open conformation with a large cavity between the domains (right, same view showing the molecular surface). Upon nopaline binding

(yellow sticks, lower panels) a closed conformation is stabilized with the ligand trapped at the interface between domains. The nopaline ligand as observed in the complex is superimposed onto the molecular surface of the apo structure (top right) for comparison purposes. **(B)** Stereo view showing the structural superimposition of the RM of the apo MltF (green ribbon) with the open conformation of the PBP NocT (PDB 4POI) (dark blue ribbon). Strong differences are observed in the domain arrangement between the two structures. **(C)** Stereo view showing the structural superimposition of the RM of the apo MltF (green ribbon) with the closed conformation of the PBP NocT in complex with nopaline (PDB 4POX) (blue ribbon). In the presence of nopaline NocT adopts a similar conformation to that found in apo MltF.

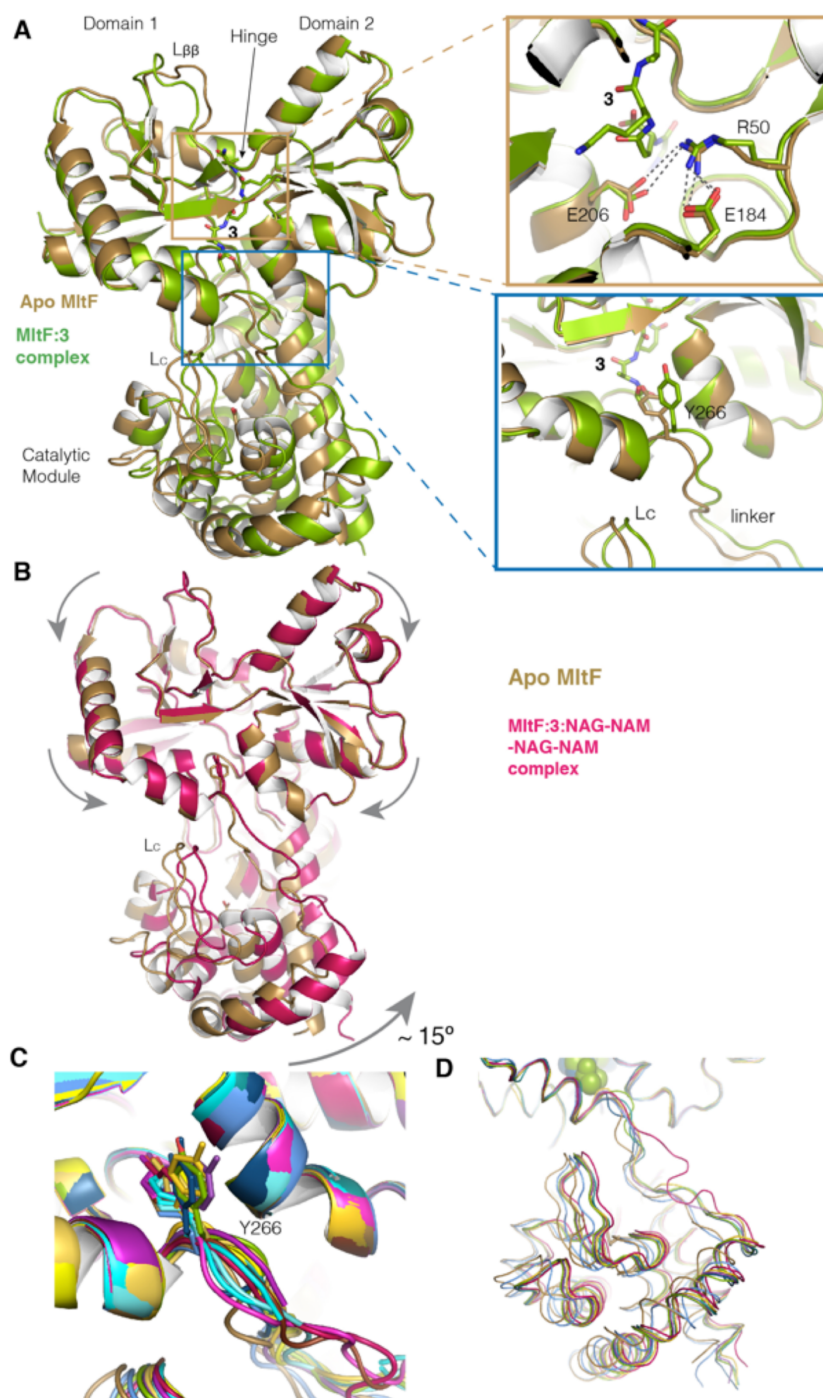


**Figure S4 related to Figure 3. Binding of mucopeptide 2, 3 and 1 to regulatory module in MltF.**

(Top) Stereo view showing polar interactions of the pentapeptide L-Ala-γ-D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala (DAP for diaminopimelate) (depicted as capped sticks in orange for the carbon atoms) in the MltF:2 complex. The L-Ala-γ-D-Glu segment has polar interactions with Ser158, Tyr94, Ser160, His161 and Gly109 in the cleft. The terminal D-Ala-D-Ala moiety is hydrogen bonded with Arg50, Tyr266, Glu206 and Asn205.

(Middle) Stereo view showing polar interactions of tetrapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys-D-Ala (depicted as capped sticks in yellow for the carbon atoms) in the MltF:3 complex. Residues interacting with ligand are depicted as capped sticks and labeled. The L-Ala- $\gamma$ -D-Glu segment is hydrogen bonded with Asn205, Glu67, Asp203, Thr111 and Gly109. The L-Lys forms hydrogen bonds with Leu156, His161 and Ser159 and the terminal D-Ala makes polar interactions with Tyr94.

(Bottom) Stereo view showing polar interactions of pentapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala (depicted as capped sticks in magenta for the carbon atoms) in the MltF:1 complex. The L-Ala- $\gamma$ -D-Glu segment of the mucopeptide is hydrogen bonded with different residues in the substrate-binding cavity (Glu163, Tyr94, Gly158, Ser160, Thr111, His161). The DAP moiety establishes hydrogen bonds with the main chain of Gly109, Leu156 and with His161. The D-Ala-D-Ala moiety is hydrogen bonded with Asp203, Arg50, Glu67, Asn205, Ala54 and Tyr266.

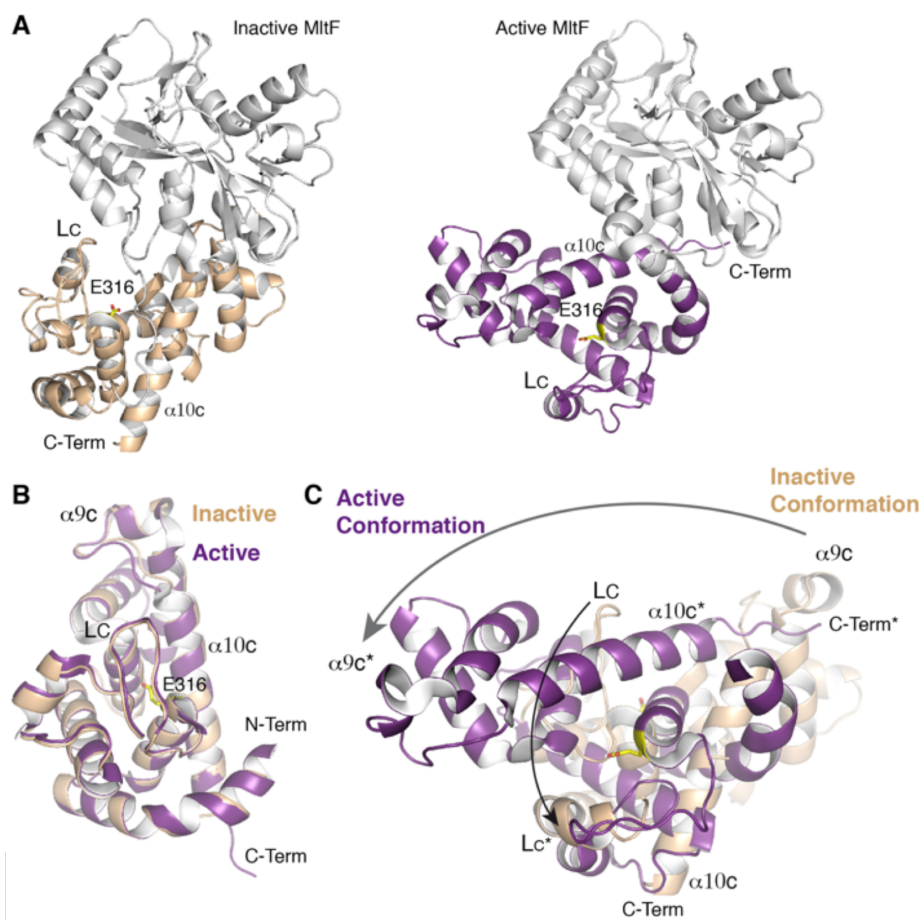


**Figure S5 related to Figure 4. Allosteric signal transmission from the ABC transporter module to the Catalytic Module upon mucopeptide binding.**

(A) Superimposition of the crystal structure of apo MltF (brown ribbon) with the crystal structure of MltF:3 complex (green ribbon). The mucopeptide is depicted as capped sticks and colored in green for carbon atoms. Right, details of the changes observed between both structures. Up, expansion of the light-brown

box showing changes in the salt-bridge interaction network of the RM. Ligand binding alters the main network of salt-bridge interactions by increasing slightly distances between Arg50 and its negatively charged partners, specially with Asp206. Down, expansion of the light-blue box showing changes observed at the beginning of the linker region (Y266). **(B)** Superimposition of the crystal structure of apo MltF (brown ribbon) with the most changed monomer observed in the MltF:3:NAG-NAM-NAG-NAM complex. Arrows indicate movements observed in the RM and in the CM. **(C)** Different conformations observed for Tyr266 in the 26 MltF structures. **(D)** Details of the movements observed in the CM are show by superimposition of the crystal structure of apo MltF (brown ribbon) and eight representative structures of the movements observed in the MltF complexes (selected from 24 structures). Muropeptides bound at the ABC transporter are depicted as spheres.





**Figure S6 related to Figure 6. Structural comparison between structures of the inactive conformation MltF (this work) and the fully open conformation for the same enzyme (PDB 4P11).**

(A) Left, three-dimensional structure of the inactive MltF with the catalytic module colored in wheat. Catalytic Glu316 is depicted as capped stick and is colored in yellow for carbon atoms. Right, the same perspective for the three-dimensional structure of active MltF with the catalytic module colored in magenta. Catalytic Glu316 is depicted as capped stick and colored in yellow for carbon atoms. (B) Structural superimposition of catalytic modules in the inactive and active conformations (same color-coding as in panel A). Both modules present a nearly identical three-dimensional structure (rmsd of 0.34 Å for 145 Ca atoms). (C) Disposition of catalytic modules in the inactive conformation (colored in wheat and in the same perspective as in the panel A) and the fully open conformation of MltF (colored in magenta) when



their regulatory modules are superimposed. Some equivalent regions are labeled (asterisk corresponds to the active conformation) for comparison purposes. Activation of the protein involves rotation of  $129^\circ$  and displacements of  $>55 \text{ \AA}$  by the CM (for the  $\alpha 9c$  region) (see also Movie S2).

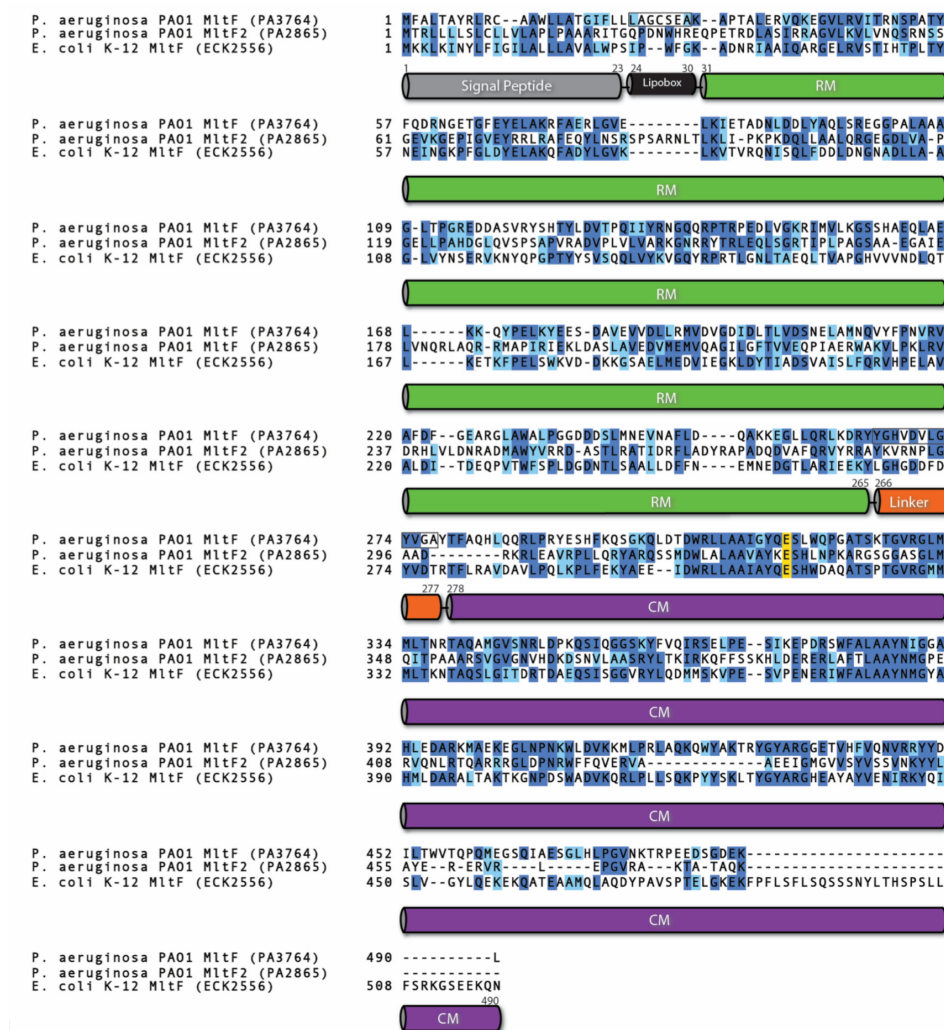


Figure S7 related to Figure 2. Multiple sequence alignment of the conserved RM-linker-CM domains of *P. aeruginosa* MltF (PA3764), *P. aeruginosa* MltF2 (PA2865), and *E. coli* MltF (ECK2556).

The domain diagrams and amino-acid numbers correspond to *P. aeruginosa* MltF. The catalytic glutamate (E316) is highlighted in yellow. Dark blue indicates residue identity for at least two of the three proteins, while light blue indicates residue similarity. *P. aeruginosa* MltF encodes a 'LAGCSEA' lipobox motif that targets the protein to the outer leaflet of the inner membrane, at which point the signal peptide (residues 1–23) and the 'LAG' of the lipobox (residues 24–26) are cleaved. The 'LAGCSEA' lipobox sequence in *P. aeruginosa* is interpreted as a LolA avoidance sequence (Narita et al. 2007) that will retain MltF in the inner membrane.

Neither *P. aeruginosa* MltF2 nor *E. coli* MltF has a lipobox. *E. coli* MltF is shown by experiment to be anchored to the inner leaflet of the outer membrane (Scheurwater and Clarke, 2008) *P. aeruginosa* MltF2 may be presumed to have this same location. The RM-linker-CM domains of *P. aeruginosa* MltF (residues 31–479) share 38% sequence identity and a 57% sequence similarity with *E. coli* MltF. *P. aeruginosa* MltF2 (residues 40–326) shares 26% sequence identity and 43% sequence similarity with *E. coli* MltF. *P. aeruginosa* MltF (residues 40–453) shares 26% sequence identity and 43% sequence similarity with *P. aeruginosa* MltF2. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 encodes 4 proteins with a SBP\_bac\_3 domain: PA3764 (MltF), PA2865 (MltF2), PA5076 (probable binding protein component of ABC transporter), PA3865 (probable amino-acid-binding protein) (Winsor et al., 2011). PA5076 and PA3865 are single RM domain proteins, having neither a linker nor an attached catalytic module.

## 2- Supplemental Movies

**Movie S1 related to Figure 4. Structural changes in MltF upon mucopeptide 3 binding at the RM.**

**Movie S2 related to Figure 6. Targeted-molecular dynamics simulation between the closed conformations of MltF (this work) and the fully open crystal structure (PDB ID: 4P11).** Modules are colored as in Figure

## 3- Supplemental Experimental Procedures

### 3.1 Sequence Alignments

Multiple sequence alignment of *P. aeruginosa* MltF (PA3764), *P. aeruginosa* MltF2 (PA2865), and *E. coli* MltF (ECK2556) (Figure S1) was generated by T-Coffee protein-sequence alignment tool (manually adjusted) (Notredame et al., 2000). The sequences of the 31 MltF homologues of *Pseudomonas* species were collected from the *Pseudomonas* Genome Database and a sequence alignment (Figure S7) was generated by CLUSTAL O(1.2.1) (manually adjusted) (Sievers et al., 2011, Winsor et al., 2011).

## 4- Supplemental References

Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., Hölte, J.-V. (2002). Effects of Multiple Deletions of Murein Hydrolases on Viability, Septum Cleavage, and Sensitivity to Large Toxic Molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184, 6093-6099.

- Holm, L., Rosenström, P.(2010). Dali server: Conservation mapping in 3d. *Nucleic Acids Res.* , 38, w545-w549.
- Lee, M., Artola-Recolons, C., Carrasco-Lopez, C., Martinez-Caballero, S., Heseck, D., Spink, E., Lastochkin, E., Zhang, W., Hellman, L. M., Boggess, B., Hermoso, J. A., Mobashery, S. (2013). Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc*, 135, 12604-7.
- Narita, S., Tokuda, H. (2007). Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 282, 13372-8.
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Mol. Biology*, 302, 205-217.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega. *Mol. Syst. Biol*, 7, 539-539.
- Scheurwater, E. M., Clarke, A. J. (2008). The C-terminal domain of *Escherichia coli* yfhd functions as a lytic transglycosylase. *J. Biol. Chem.*, 283, 8363-73.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W., Brinkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* genome database: improved comparative analysis and population genomics capability for pseudomonas genomes. *Nucleic Acids Res.* ,39, d596-d600.

### 4.3.1. Discusión

La MltF fue expresada como una proteína soluble (sin su secuencia lipobox) y fue cristalizada. La enzima se resolvió por la técnica de dispersión anómala utilizando derivados de Se-Met a una resolución de 2.6 Å. El modelo resultante fue utilizado como modelo inicial de reemplazo molecular obteniéndose dos moléculas por unidad asimétrica y una resolución final de 1.8 Å. La estructura tridimensional confirma que la enzima tiene dos módulos bien definidos: el modulo catalítico (CM) que guarda similitud con otros dominios ya resueltos de LTs y el domino regulador (RM) unidos entre sí por un conector. De acuerdo con la clasificación de las proteínas de unión a sustrato, el RM pertenece al tipo IV que une aminoácidos. Este RM consta de dos dominios unidos entre sí por una bisagra flexible. Se ha descrito en la literatura que las SBPs tienen dos conformaciones: una abierta en ausencia de ligando y otra cerrada en presencia del mismo (Berntsson et al., 2010). Sin embargo, en el caso de MltF el RM muestra siempre una conformación cerrada independientemente de la presencia o no del ligando.

A pesar de que el sitio activo del CM presenta una cavidad capaz de albergar hasta seis azúcares, su acceso está bloqueado por dos bucles: uno del CM (bucle Lc), otro del RM (bucle LR) y el conector. Además de estos impedimentos estéricos la Arg60 del RM está formando un puente salino con el residuo catalítico (E316).

Dada la conformación inactiva de MltF y la posible unión de péptidos al RM, se decidió explorar la hipótesis de que el RM pudiera regular la actividad lítica de MltF.

Para ello se llevaron a cabo ensayos de cristalización utilizando muropéptidos sintéticos (NAG-anhNAM-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*DAP-D-Ala-D-Ala (compuesto 1), NAM-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*DAP-D-Ala-d-Ala (compuesto 2) ó l-Ala- $\gamma$ -D-Glu-l-Lys-D-Ala (compuesto 3)).

Las tres estructuras así obtenidas para los complejos con muropéptidos presentan un grupo especial diferente obtenido para la estructura apo y con 4 moléculas en la unidad asimétrica (frente a las dos moléculas de la estructura apo).

Los tres complejos presentan importantes cambios estructurales tanto en la región del conector como en la disposición modular de MltF. Los cambios se producen en la región del conector y del CM. Como consecuencia de esto, en estas estructuras cristalográficas se puede observar cómo la región del conector actúa como un péndulo y hace rotar hasta 11° el CM que se comporta como un cuerpo rígido.

A pesar de estos notables cambios estructurales el sitio activo sigue ocluido. Experimentos de inmersión exponiendo al cristal simultáneamente con el compuesto 3 y el sustrato NAG-NAM-NAG-NAM provoca la fractura del cristal pudiéndose medir uno de ellos. En esta ocasión la estructura cristalográfica presenta 12 moléculas por unidad asimétrica y el grupo espacial es también diferente. En esta estructura la rotación máxima observada fue de 15°, que se puede apreciar en distintas cadenas. Así pues, en este artículo se presentan 24 estructuras independientes que muestran la progresión para la activación de la enzima con diferentes grados de rotación. Durante la escritura del artículo científico, se liberaron en el PDB seis estructuras de MltF (estructura en su forma apo, estructuras en complejo con Leu, Ile, Cys y Val en RM y la estructura en complejo con bulgécina en el CM). Todas estas estructuras se encuentran en la conformación activa y son muy parecidas entre sí (RMSD= 0.2-0.8 Å). De estas estructuras se pueden sacar dos conclusiones: la primera es que la estructura apo de MltF en este caso se activó posiblemente durante el proceso de purificación y/o de cristalización y la segunda es que la enzima una vez activa permanece en esa conformación haya o no ligando en cualquiera de los módulos.

Estudios de dinámica molecular dirigida demuestran que para pasar de la conformación inactiva a la activa se requiere una flexibilidad elevada en el conector que permita que el CM, que actúa como un cuerpo rígido, se desenganche del RM para poder reorientarse.

Para demostrar que MltF se activaba por interacción como los muropéptidos, se realizó un experimento monitorizado por LC/MS utilizando el compuesto 3 derivados naturales de la pared bacteriana (procedentes del sáculo de la misma) y la enzima cristalizada para garantizar una población homogénea de la conformación inactiva de la proteína. Los cristales se lavaron con solución madre (25% de EG) y se hicieron reaccionar con cadenas glicánicas purificadas de la pared, pero sin péptido. Cuando el experimento se realizó en ausencia de péptido la enzima no catalizaba la reacción, sin embargo, en presencia del mismo la enzima sí presentaba actividad catalítica confirmando así la dependencia del péptido de la pared para la activación de la enzima.

Con este trabajo queda demostrado el mecanismo regulador de MltF para el control de la actividad catalítica que va acompañado de un drástico cambio conformacional. Los experimentos realizados por HPLC confirman que una vez activa, MltF es mayoritariamente una enzima endolítica.

Es posible que las amidasas periplásmicas (AmpDh2 y AmpDh3) desencadenen esta regulación ya que son las responsables de cortar la parte peptídica. Este trabajo presenta la primera LT regulada alostéricamente.





## 5. MATERIAL INÉDITO

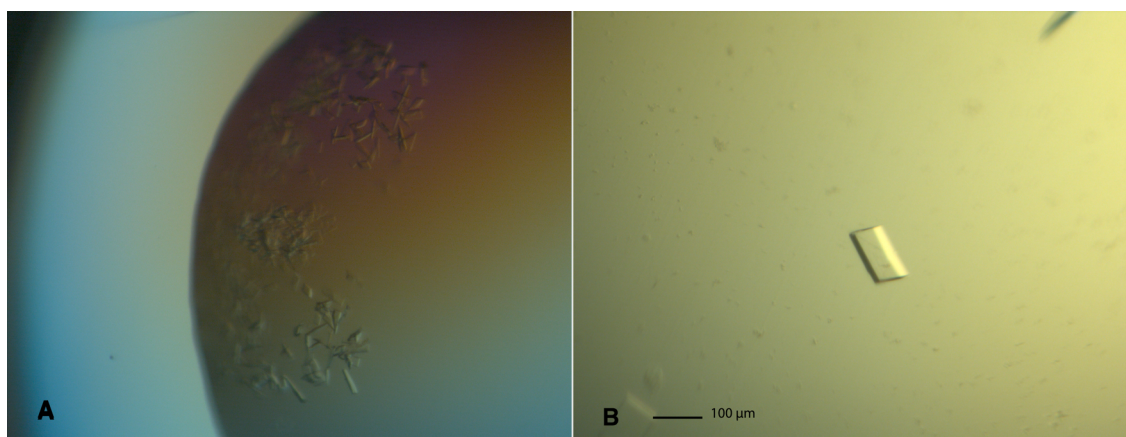


## 5.1 Anexo I. Cristalización y resolución estructural del dominio de unión del efector (EBD) del regulador transcripcional AmpR de *P. aeruginosa*

### CRISTALIZACIÓN

Inicialmente se probaron alrededor de 500 condiciones de cristalización con la proteína soluble a una concentración de 12 mg/ml. Se obtuvieron pequeños cristales (Fig. I) en tres condiciones diferentes:

- 10% PEG 3350, 9% de glicerol y 100 mM MES pH= 6.2.
- 100 mM Hepes pH= 8, 20% PEG 3350.
- 8% PEG 4000 800 mM Cl<sub>2</sub>Li y 100 mM Tris pH= 8.

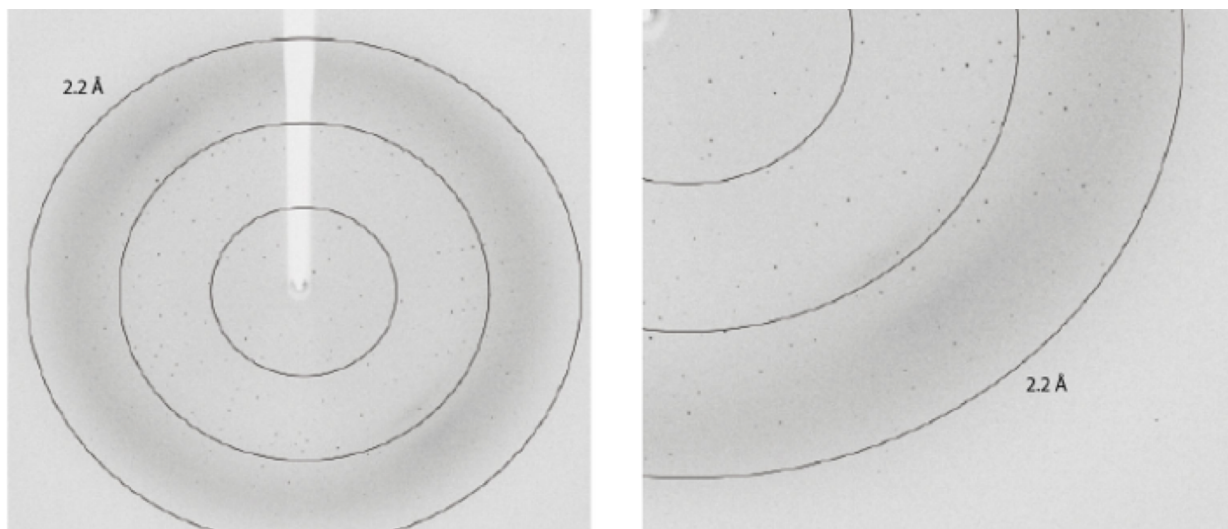


**Figura I.** Cristales de AmpR. **(A)** Cristales iniciales. **(B)** Cristales optimizados.

La optimización de los cristales obtenidos se llevó a cabo variando el pH y el porcentaje de precipitante y se probaron otras técnicas de cristalización como gota colgante o *microbatch* (ver métodos). La condición optimizada fue: 8% PEG 4000 800 mM Cl<sub>2</sub>Li y 100 mM Tris pH= 8 en *microbatch*.

## DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

La recogida de los datos de difracción se llevó a cabo en el sincrotrón de ALBA en la línea de macromoléculas XALOC (Fig. II). Se obtuvo un conjunto de datos a 2.2 Å. Los cristales pertenecen al sistema monoclinico C2, con una celdilla de  $a= 106.72$  Å,  $b= 71$  Å y  $c= 124.01$  Å,  $\beta= 112.62^\circ$ .



**Figura II.** Patrón de difracción del EBD de AmpR de *P. aeruginosa*. A la derecha se muestra una ampliación.

Los diferentes datos se indexaron, integraron y escalaron con los programas XDS (Kabsch, 2010), iMosflm (Battye et al., 2011) y Aimless (Evans and Murshudov, 2013). El EBD de AmpR se resolvió mediante la técnica de reemplazo molecular utilizando el programa PHASER (McCoy et al., 2007). Se utilizó como modelo la estructura resuelta y depositada en el PDB del dominio de unión del efector (EBD) del regulador transcripcional de AmpR de *Citrobacter freundii* (Código PDB 3KOS). La solución obtenida tras el reemplazo molecular y la corrección de las cadenas laterales se refinó con Phenix (Adams et al., 2010). Posteriormente, se realizó el modelado manual de partes de la proteína con el programa Coot (Emsley et al., 2010). Con el programa Phenix se realizaron diferentes ciclos de refinamiento. Todas las estadísticas, tanto de difracción como de refinamiento se muestran en la Tabla I.

**Tabla I.** Estadísticas de procesado y refinamiento.

	AmpR
<b>Estadísticas del Procesado</b>	
Longitud de onda (Å)	0.97926
Grupo espacial	C2
Celdilla unidad <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	166.99, 134.97, 48.75
Celdilla unidad $\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 112.6, 90
T (K)	100
Fuente de radiación	Sincrotrón
Resolución (Å)	35.50 (2.21-2.20)
Reflexiones totales	174035 (13382)
Reflexiones únicas	43111 (3708)
$I/\sigma(I)$	10.9 (3.5)
Completitud (%)	98.9 (98.9)
Redundancia	4.0 (3.6)
$R_{\text{pim}}$	0.10 (0.51)
CC1/2	0.98 (0.58)
<b>Estadísticas del Refinamiento</b>	
Resolución (Å)	2.2
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.19/0.24
No. de Átomos	6818
Proteína	6312
Factores de agitación (Å <sup>2</sup> )	
Proteína	29.90
Agua	33.48
Desviaciones RMSD	
Distancias (Å)	0.009
Ángulos (°)	1.06

Los valores entre paréntesis hacen referencia a la última capa de resolución.

## IMPLICACIONES BIOLÓGICAS

La hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas como AmpC es uno de los mecanismos que utilizan las bacterias para luchar contra los antibióticos. La expresión de AmpC está mediada por el regulador AmpR. *AmpR* y *ampC* son genes que pertenecen a un operón divergente. La capacidad de inducción de AmpC está íntimamente ligada con el reciclaje

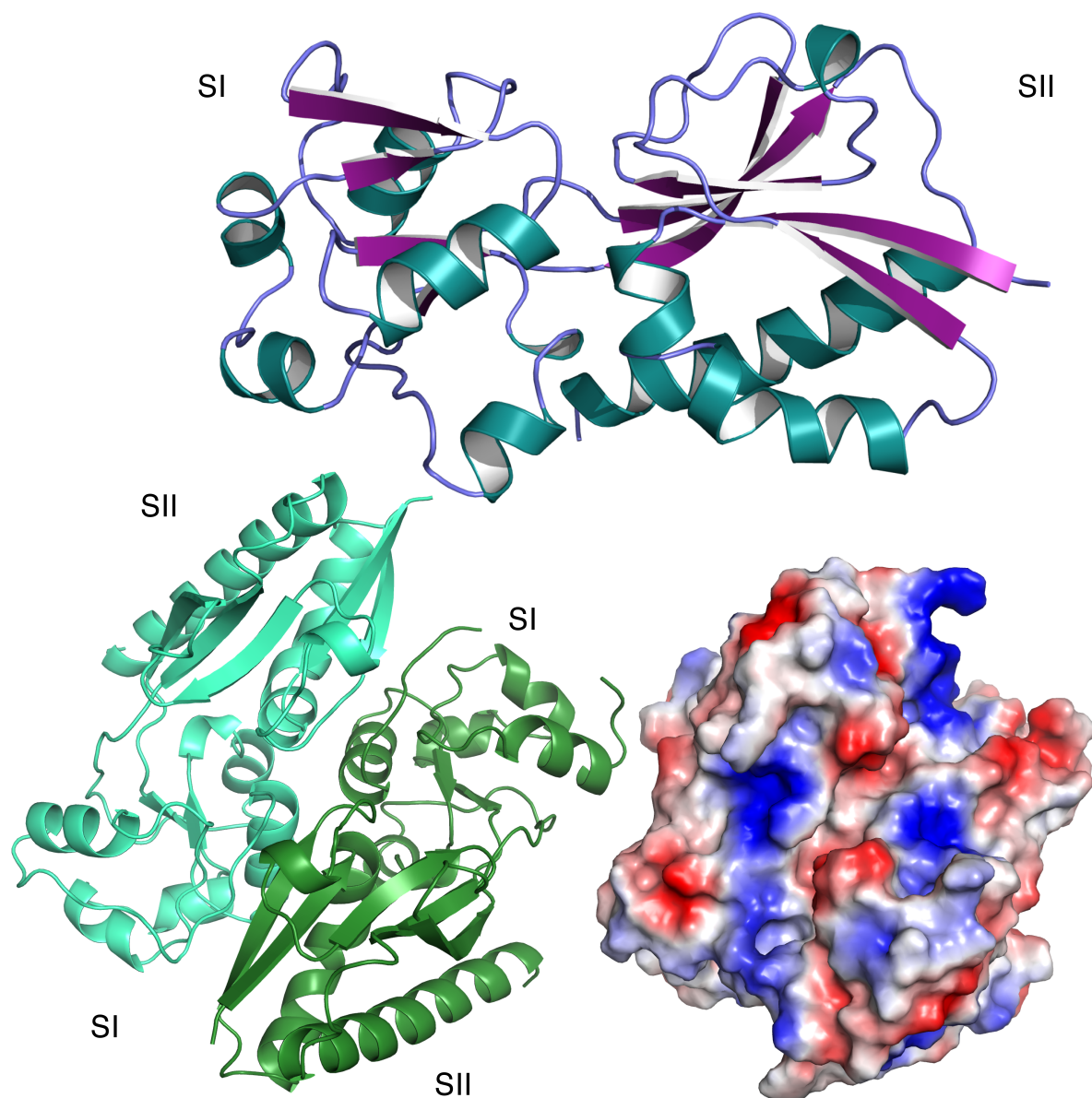
de la pared del PG. En presencia de  $\beta$ -lactámicos, de algún modo aún desconocido, los fragmentos procedentes del reciclaje de la pared inducen la sobreexpresión de AmpC regulada por AmpR.

## ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE AMPR

AmpR tiene dos dominios bien diferenciados, el dominio efector y el dominio de unión DNA. Hasta la fecha no se ha resuelto el dominio de unión a DNA y del dominio efector sólo se conoce la estructura de *C. freundii*.

El dominio efector de AmpR tiene 298 aminoácidos, en la estructura cristalográfica se observan del 93 al 298. AmpR forma un homodímero. Cada monómero a su vez consiste en dos plegamientos  $\alpha/\beta$  de Rossmann formando dos subdominios I y II (Fig. III), estos dos subdominios están unidos entre sí por una bisagra, y en la zona central se encuentra la zona de reconocimiento del péptido (Fig. III).

El subdominio I comprende los residuos desde el 93 hasta el 161 y el II desde el 162 hasta el 298. El plegamiento del EBD de AmpR es similar a otros EBD de la familia de los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR), familia a la que pertenece (Maddocks and Oyston, 2008).



**Figura III.** Estructura tridimensional del EBD de AmpR. Arriba la estructura general del EBD de AmpR mostrando los elementos de estructura secundaria. Abajo a la izquierda representación del homodímero mostrando los elementos de estructura secundaria y a la derecha representación del potencial electrostático. En azul se representan las regiones de carácter básico, mientras que en rojo aparecen las regiones ácidas.

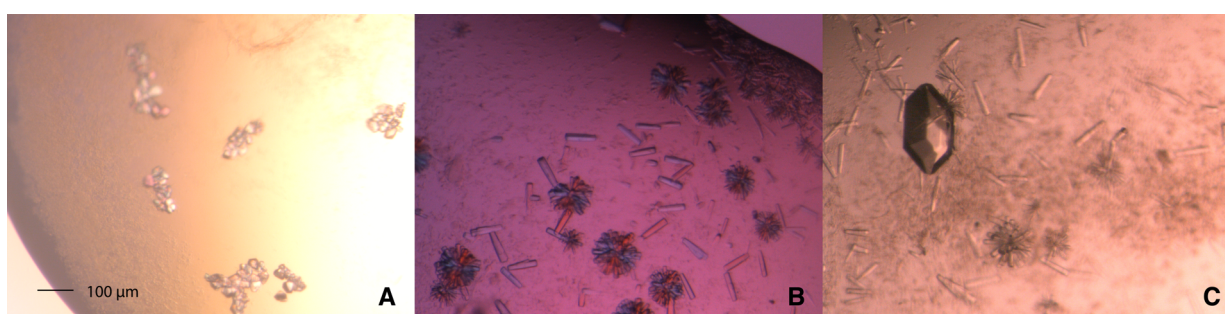




## 5.2 Anexo II. Cristalización y resolución estructural de la transglicosilasa lítica Slt

### CRISTALIZACIÓN

Se realizó un muestreo masivo de condiciones de cristalización, se obtuvieron pequeños cristales en más de una condición. Se optimizaron varias de ellas siendo la mas prometedora: 1.4 M Na/K PO<sub>4</sub> y pH= 6.5.



**Figura IV.** Cristales de AmpR. (A-C) Evolución en la optimización de los cristales.

La optimización se llevó a cabo variando el pH y la concentración de Na/K PO<sub>4</sub>, estos experimentos se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor. Los cristales optimizados (Fig. IV) fueron de tamaño suficiente para su posterior difracción en el sincrotrón. Se utilizó una solución crioprotectora de Li<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> y condición de cristalización en la proporción 50:50 (v/v).

El complejo de Slt se obtuvo incubando los cristales con el ligando (NAM-NAG pentapéptido)<sub>2</sub> (DHL100 en Fig. VII) a una concentración de ligando 5 mM durante 12 horas.

### DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

Los cristales de Slt se midieron en el sincrotrón europeo de ESRF (Grenoble) obteniéndose un conjunto de datos de difracción a 2.2 Å de resolución, los cristales pertenecen al sistema cristalino hexagonal P6<sub>3</sub>. En la tabla II se recogen los resultados obtenidos del procesado de imágenes.

**Tabla II.** Estadísticas de procesado y refinamiento.

	Slt	Slt-NAG-AnhNAM
<b>Estadísticas del Procesado</b>		
Grupo espacial	P 6 <sub>3</sub>	P 6 <sub>3</sub>
Celdilla unidad <i>a, b, c</i> (Å)	163.98 163.98 56.70	165.52 165.52 54.73
T (K)	100	100
Fuente de radiación	Sincrotrón	Sincrotrón
Resolución (Å)	41-2.2 (2.28 - 2.2)	45.65-2.5 (2.59 - 2.5)
Reflexiones totales	864754 (74115)	327791 (36517)
Reflexiones únicas	44559 (3846)	30001 (3385)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	14.8 ( 1.2)	14.9 (1.8)
Compleitud (%)	100.0 ( 100.0)	99.9 (99.9)
Redundancia	19.4 ( 19.3)	10.9 (10.8)
<i>R</i> <sub>pim</sub>	0.05 ( 0.86)	0.032 (0.41)
CC1/2	0.99 ( 0.70)	0.99 (0.70)
<b>Estadísticas del Refinamiento</b>		
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.21/0.25	0.20/0.24
No. de Átomos	5065	5009
Proteína	4958	4940
Factores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	28.86	65.91
Agua	40.33	50.75
Ligando	-	88.86
Desviaciones RMSD		
Distancias (Å)	0.011	0.009
Ángulos (°)	1.31	1.09

Los valores entre paréntesis hacen referencia a la última capa de resolución.

Los cristales del complejo de Slt con (NAG -NAM-pentapéptido)<sub>2</sub>. Los cristales de Slt se midieron en el sincrotrón de ALBA (Barcelona) obteniéndose un conjunto de datos de difracción a 2.5 Å de resolución, los cristales pertenecen al sistema cristalino hexagonal, P6<sub>3</sub> con unas dimensiones de celdilla *a*= 163.98, *b*= 163.98 y *c*= 56.71 Å.

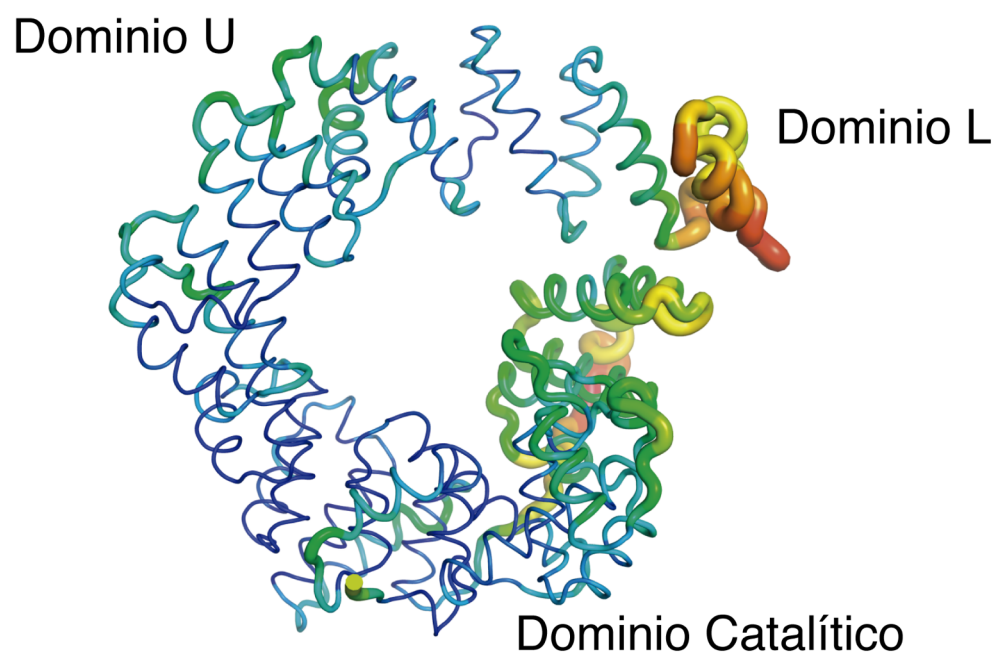
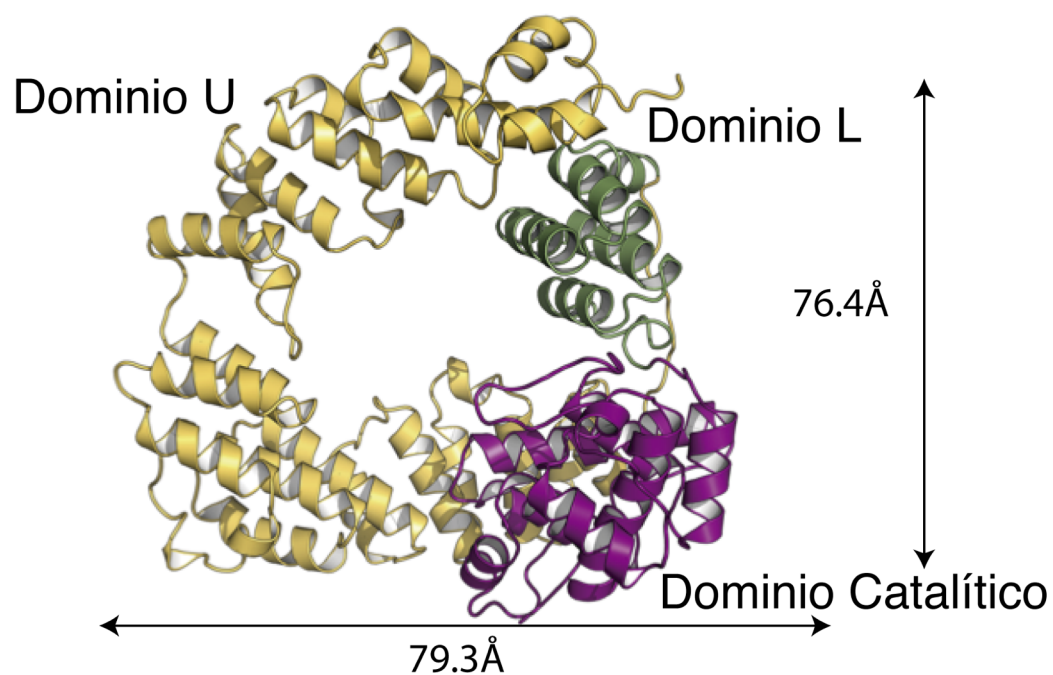
## RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE Slt

Los diferentes datos de difracción se indexaron, integraron y escalaron con los programas XDS (Kabsch, 2010), iMosflm (Battye et al., 2011) y Aimless (Evans and Murshudov, 2013). La estructura tridimensional de Slt se resolvió *de novo* utilizando el programa de *Arcimboldo* (Rodriguez et al., 2012).

Posteriormente se modeló y se corrigieron de forma manual partes de la proteína con el programa Coot (Emsley et al., 2010). Con el programa Phenix (Adams et al., 2010) se realizaron diferentes ciclos de refinamiento (Tabla II).

## RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO Slt: NAG-AnhNAM

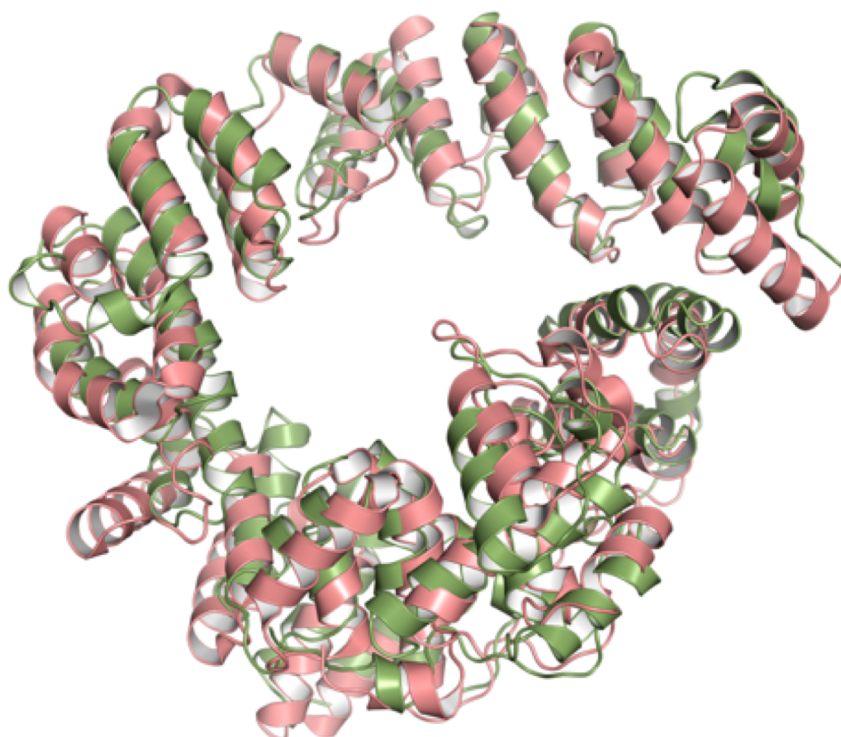
Los diferentes datos se indexaron, integraron y escalaron con los programas XDS (Kabsch, 2010), iMosflm (Battye et al., 2011) y Aimless ((Evans and Murshudov, 2013). La estructura de Slt con el complejo se resolvió mediante la técnica de reemplazo molecular utilizando el programa MOLREP. Se utilizó como modelo inicial la estructura resuelta de Slt en su forma apo. La solución obtenida tras el reemplazo molecular y la corrección de las cadenas laterales se refinó con Phenix (Adams et al., 2010). Posteriormente se modeló y se corrigieron de forma manual partes de la proteína con el programa Coot (Emsley et al., 2010). Con el programa Phenix se realizaron diferentes ciclos de refinamiento (Tabla II).



**Figura V.** Estructura tridimensional del Slt. Arriba, estructura general de Slt mostrando los elementos de estructura secundaria. Abajo, representación de los factores de agitación térmica.

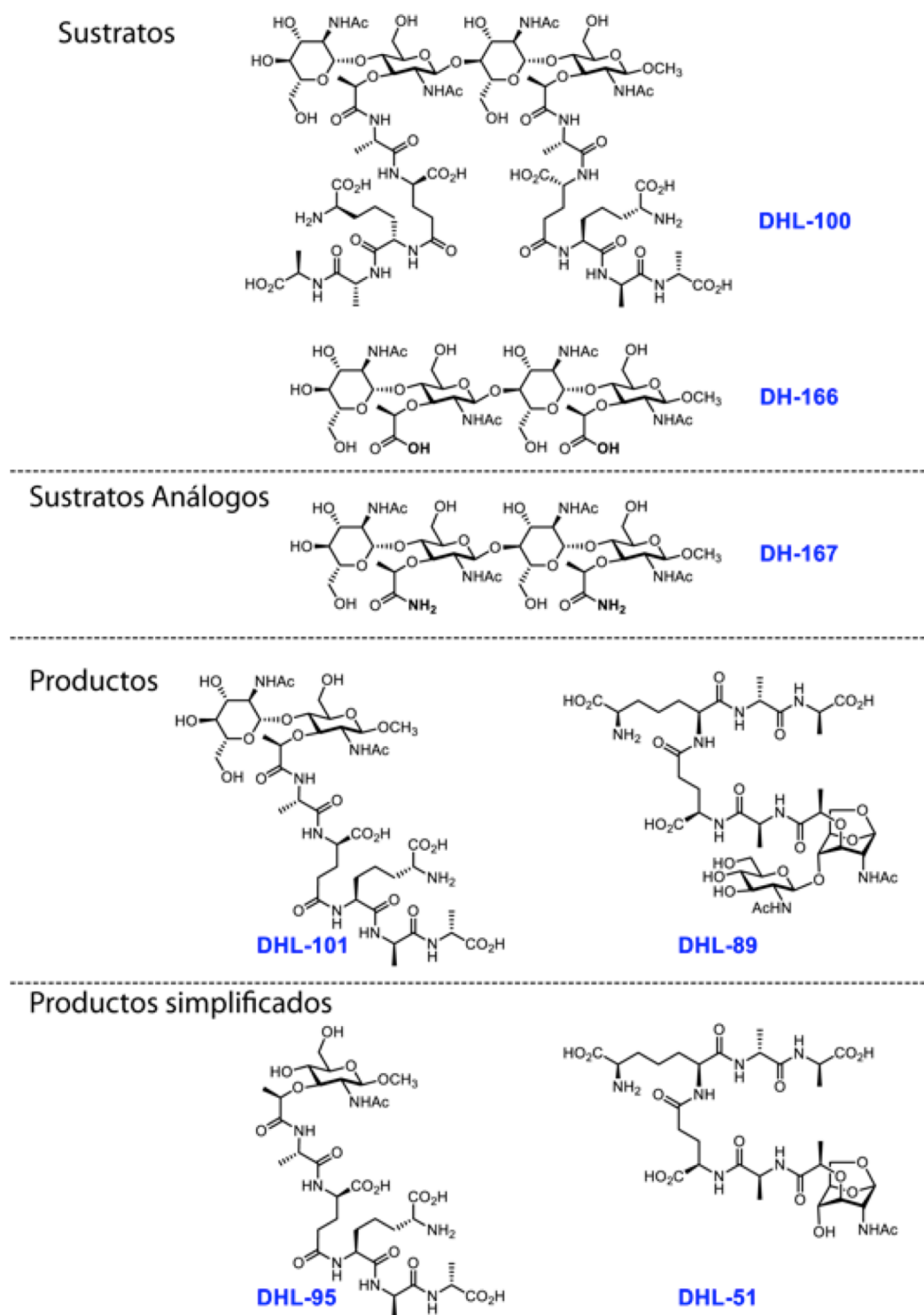
## ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE SLT

La estructura de Slt tiene una forma de anillo con dimensiones 76.4 Å x 79.3 Å y está compuesta por tres dominios muy ricos en  $\alpha$  hélices. Como podemos ver en la Fig. V esto dominios son: el dominio N-terminal o dominio “U”, el dominio C-terminal o dominio “L” y por último el dominio catalítico. El dominio catalítico es semejante al dominio de Slt70 de *E. coli*, que es la primera estructura resulta de las transglicosilasas líticas (Thunnissen et al., 1994). Tanto los dominios catalíticos Slt como Slt70 comparten similitud con el plegamiento de la lisozima de ganso (Thunnissen et al., 1995), la cual está formada por dos lóbulos unidos mediante una  $\alpha$  hélice. El sitio catalítico presenta seis subsitios de unión a azúcares, que van desde el -4 hasta el +2 (teniendo en cuenta que según el convenio de la lisozima la reacción se cataliza entre las posiciones -1 y +1 (Thunnissen et al., 1995).



**Figura VI.** Superposición de los monómeros de Slt (*P. aeruginosa*) en verde y de slt70 (*E. coli*) en rosa.

Cuando superponemos Slt con Slt70 el RMSD es de 3,48 Å (Fig. VI), lo cual nos confirma que a pesar de tener una estructura global parecida existen ciertas diferencias sustanciales entre ellas.

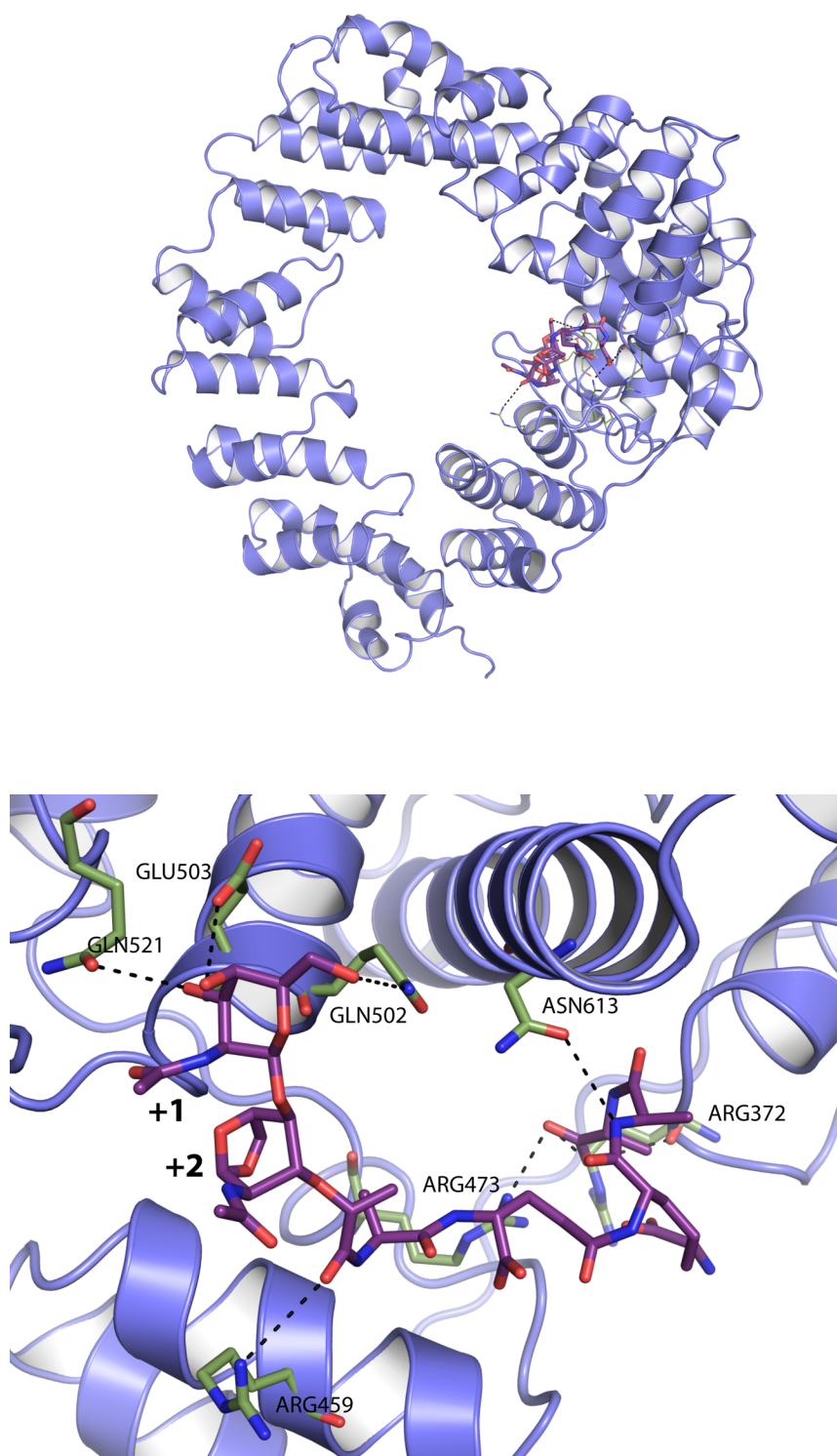


**Figura VII.** Ligandos empleados para la cristalización de Slt.

Para completar el estudio de Slt y elucidar su mecanismo de acción, se realizaron experimentos, tanto de inmersión como de cocrystalización, en presencia de ligandos. Como ligandos se utilizaron diferentes fragmentos de PG sintéticos producidos por el grupo colaborador del profesor Shahriar Mobashery en la universidad de Notre Dame (Indiana, USA) (Fig. VII).

Se obtuvieron datos de difracción de Slt incubado con DHL-100, el mapa de densidad electrónica sin embargo reveló que la molécula presente en el cristal era la del producto de la reacción (AnhNAM-NAG pentapéptido). En la figura VIII se muestran las interacciones del ligando con la proteína. Los residuos Arg459, Arg473, Arg372 y Asn613 estabilizan la parte peptídica mientras que los residuos Gln502, Glu503 y Gln521 estabilizan la parte glicánica. Como se observa en la estructura tridimensional global (Fig. VIII), la interacción de la proteína con el PG sería distinta que la propuesta para SltB3, a pesar de que ambas proteínas presentan una forma anular.





**Figura VIII.** Arriba, estructura tridimensional de Slt en azul en complejo con AnhNAM-NAG pentapéptido en morado. Abajo, detalle de las interacciones del complejo Slt:AnhNAM-NAG, el ligando se muestra en morado en modelo de varillas.



# CONCLUSIONES



1. Se ha cristalizado SltB3 de *P. aeruginosa*, y se ha resuelto su estructura tridimensional a una resolución de 1.61 Å. La estructura presenta una forma anular única formada por cuatro dominios: el dominio N-terminal, el dominio catalítico, el dominio  $\alpha\beta$  y el dominio de unión a PG.
2. Se han resuelto las estructuras cristalográficas de los complejos de SltB3 con dos análogos de la pared del PG: sustrato y producto. En ningún caso se aprecia densidad para la parte peptídica lo que indicaría que los péptidos no son reconocidos por SltB3.
3. El análisis de la cavidad de unión a sustrato ha permitido demostrar que la enzima adapta su conformación durante la catálisis dependiendo de si tiene el sustrato o el producto unido.
4. La combinación de estudios de LC/MS/MS con los estudios cristalográficos han servido para proponer un mecanismo catalítico para SltB3. El análisis estructural del complejo con el análogo del sustrato ha revelado la interacción del oxígeno glicosídico (posición +1) con el glutámico catalítico (E145) y con el grupo amida de Asn328.
5. La estructura tridimensional de los complejos unido a la estructura tridimensional del PG resuelta por RMN permiten proponer un modelo de como la cadena del PG interacciona con la estructura anular de SltB3.
6. En esta tesis se presenta un extenso trabajo bibliográfico sobre las estructuras que se han resuelto y caracterizado hasta ahora relacionadas con el reciclaje de la pared del PG y sus implicaciones en la resistencia a antibióticos.
7. Se ha cristalizado MltF y se ha resuelto su estructura mediante difracción anómala con derivados de Se-Met a 1.80 Å de resolución. La estructura presenta dos módulos: el módulo regulador y el módulo catalítico. El módulo catalítico tiene una cavidad capaz de acomodar hasta seis azúcares y el módulo regulador guarda similitud con las proteínas de unión a sustrato del tipo IV que une aminoácidos.
8. Se demuestra la existencia de un mecanismo regulador en MltF que controla su actividad catalítica y que va acompañado de un drástico cambio conformacional.

9. Experimentos de cromatografía líquida de alta afinidad monitorizados por espectrometría de masas de la enzima cristalizada confirman la importancia de los murepéptidos en la regulación de MltF.
10. Estudios de dinámica molecular dirigida confirman la necesidad de una elevada flexibilidad del conector para que el CM, se desenganche del RM y se pueda reorientar para su activación.
11. Se determinó la estructura tridimensional de Slt *de novo* utilizando el programa *Arcimboldo* a 2.2 Å de resolución. Slt es una proteína de elevado peso molecular (73.40 kD) muy rica en  $\alpha$  hélices y con tres dominios. El sitio catalítico presenta seis subsitios de unión a azúcar.
12. Se obtuvo la estructura tridimensional de Slt en complejo con el producto de la reacción (NAG-AnhNAM pentapéptido). La calidad de la densidad electrónica del mapa permite establecer las interacciones de la proteína tanto con la parte glicosídica como con la parte peptídica.
13. Se ha determinado y caracterizado por cristalografía de rayos X el dominio de unión del efector del regulador transcripcional AmpR. La proteína forma un homodímero, y cada monómero a su vez está formado por dos subdominios que reconocerían en su interfase al péptido activador de la resistencia a antibióticos.

# BIBLIOGRAFIA



Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 213-221.

Balcewich, M. D., Reeve, T. M., Orlikow, E. A., Donald, L. J., Vocadlo, D. J. & Mark, B. L. (2010). *Journal of molecular biology* **400**, 998-1010.

Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. (2011). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 271-281.

Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J. & Poolman, B. (2010). *FEBS letters* **584**, 2606-2617.

Blackburn, N. T. & Clarke, A. J. (2001). *Journal of molecular evolution* **52**, 78-84.

Blackburn, N. T. & Clarke, A. J. (2002). *Biochemistry* **41**, 1001-1013.

Boneca, I. G., Huang, Z. H., Gage, D. A. & Tomasz, A. (2000). *The Journal of biological chemistry* **275**, 9910-9918.

Cavallari, J. F., Lamers, R. P., Scheurwater, E. M., Matos, A. L. & Burrows, L. L. (2013). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 3078-3084.

Cheng, Q., Li, H., Merdek, K. & Park, J. T. (2000). *Journal of bacteriology* **182**, 4836-4840.

Cho, H., Uehara, T. & Bernhardt, T. G. (2014). *Cell* **159**, 1300-1311.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 486-501.

Evans, P. R. & Murshudov, G. N. (2013). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **69**, 1204-1214.

Fisher, J. F. & Mobashery, S. (2014). *Bioorganic chemistry* **56**, 41-48.

Gisin, J., Schneider, A., Nagele, B., Borisova, M. & Mayer, C. (2013). *Nature chemical biology* **9**, 491-493.

Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. & Holtje, J. V. (2002). *Journal of bacteriology* **184**, 6093-6099.

Jacobs, C., Huang, L. J., Bartowsky, E., Normark, S. & Park, J. T. (1994). *The EMBO journal* **13**, 4684-4694.

Johnson, J. W., Fisher, J. F. & Mobashery, S. (2013). *Annals of the New York Academy of Sciences* **1277**, 54-75.

Joosten, R. P., Womack, T., Vriend, G. & Bricogne, G. (2009). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **65**, 176-185.

Juan, C., Moya, B., Perez, J. L. & Oliver, A. (2006). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 1780-1787.

Kabsch, W. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 125-132.

Karle, J. (1991). *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography* **47 ( Pt 5)**, 537-543.

Karplus, P. A. & Diederichs, K. (2012). *Science* **336**, 1030-1033.

Lamers, R. P., Nguyen, U. T., Nguyen, Y., Buensuceso, R. N. & Burrows, L. L. (2015). *MicrobiologyOpen* **4**, 879-895.

Langae, T. Y., Gagnon, L. & Huletsky, A. (2000). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 583-589.

Lewenza, S., Mhlanga, M. M. & Pugsley, A. P. (2008). *Journal of bacteriology* **190**, 6119-6125.

Lindquist, S., Lindberg, F. & Normark, S. (1989). *Journal of bacteriology* **171**, 3746-3753.

Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. (2008). *Microbiology* **154**, 3609-3623.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *Journal of applied crystallography* **40**, 658-674.

Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Hesek, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L. & Mobashery, S. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4404-4409.

Mirelman, D. & Nuchamowitz, Y. (1979). *European journal of biochemistry / FEBS* **94**, 541-548.

Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Disteche, M., de Kruijff, B. & Breukink, E. (2011). *The EMBO journal* **30**, 1425-1432.

Narita, K., Chien, J., Mullany, S. A., Staub, J., Qian, X., Lingle, W. L. & Shridhar, V. (2007). *The Journal of biological chemistry* **282**, 14413-14420.



Ng, J. D., Gavira, J. A. & Garcia-Ruiz, J. M. (2003). *Journal of structural biology* **142**, 218-231.

Nocadello, S., Minasov, G., Shuvalova, L. S., Dubrovskaya, I., Sabini, E. & Anderson, W. F. (2016). *The Journal of biological chemistry* **291**, 14915-14926.

Reith, J. & Mayer, C. (2011). *Applied microbiology and biotechnology* **92**, 1-11.

Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. & Cornelis, P. (2010). *Microbiology* **156**, 2597-2607.

Rodriguez, D., Sammito, M., Meindl, K., de Ilarduya, I. M., Potratz, M., Sheldrick, G. M. & Uson, I. (2012). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **68**, 336-343.

Rossmann, M. G. (2001). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **57**, 1360-1366.

Scheurwater, E. M. & Clarke, A. J. (2008). *The Journal of biological chemistry* **283**, 8363-8373.

Sheldrick, G. M. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 479-485.

Suvorov, M., Lee, M., Hesek, D., Boggess, B. & Mobashery, S. (2008). *Journal of the American Chemical Society* **130**, 11878-11879.

Taylor, A. & Gorazdowska, M. (1974). *Biochimica et biophysica acta* **342**, 133-136.

Taylor, G. L. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 325-338.

Thunnissen, A. M., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Rozeboom, H. J., Engel, H., Keck, W. & Dijkstra, B. W. (1994). *Nature* **367**, 750-753.

Thunnissen, A. M., Isaacs, N. W. & Dijkstra, B. W. (1995). *Proteins* **22**, 245-258.

Uehara, T. & Park, J. T. (2002). *Journal of bacteriology* **184**, 4233-4239.

Vadlamani, G., Thomas, M. D., Patel, T. R., Donald, L. J., Reeve, T. M., Stetefeld, J., Standing, K. G., Vocadlo, D. J. & Mark, B. L. (2015). *The Journal of biological chemistry* **290**, 2630-2643.

van Asselt, E. J. & Dijkstra, B. W. (1999). *FEBS letters* **458**, 429-435.

Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. (2008). *FEMS microbiology reviews* **32**, 259-286.

von Rechenberg, M., Ursinus, A. & Holtje, J. V. (1996). *Microbial drug resistance* **2**, 155-157.

Votsch, W. & Templin, M. F. (2000). *The Journal of biological chemistry* **275**, 39032-39038.

Yunck, R., Cho, H. & Bernhardt, T. G. (2016). *Molecular microbiology* **99**, 700-718.